



TITLE:

硬組織によるマダイの水温履歴解析に関する研究(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

荒井, 修亮

CITATION:

荒井, 修亮. 硬組織によるマダイの水温履歴解析に関する研究. 京都大学, 1997, 博士(農学)

ISSUE DATE:

1997-07-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3128572>

RIGHT:

硬組織によるマダイの水溫履歴解析
に関する研究

荒井修亮

1997

目次

序	4
謝辞	7
 第 1 章 マダイ鱗の解析	8
1-1 中間育成マダイ稚魚の鱗隆起線と水温の関係 ..	8
1-1-1 研究の背景と目的	8
1-1-2 材料および方法	10
1-1-3 結果	11
1-1-4 考察	14
 1-2 マダイ稚魚期の飼育水温と鱗の隆起線形成 との関係	18
1-2-1 研究の背景と目的	18
1-2-2 材料および方法	18
1-2-3 結果	20
1-2-4 考察	21
 1-3 マダイ稚魚の鱗隆起線と水温変動	24
1-3-1 研究の背景と目的	24
1-3-2 材料および方法	24
1-3-3 結果	25
1-3-4 考察	34
 1-4 第 1 章のまとめ	37

第2章 PIXEによる魚類耳石中微量元素分析 38

2-1 研究の背景と目的	38
2-2 PIXEの原理と特長	39
2-3 PIXEによる定量分析	40
2-4 PIXEによる魚類耳石の分析例	45
2-5 第2章のまとめ	48

第3章 マダイ耳石の微量元素分析と水温 49

3-1 PIXEによるマダイ耳石中の微量元素分析	49
3-1-1 研究の背景と目的	49
3-1-2 材料および方法	50
3-1-3 結果	52
3-1-4 考察	54
3-2 飼育実験による水温とマダイ稚魚耳石中のストロンチウム - カルシウム比	57
3-2-1 研究の背景と目的	57
3-2-2 材料および方法	57
3-2-3 結果	58
3-2-4 考察	59
3-3 マダイ稚魚の耳石中に含まれる微量元素と水温	61

3-3-1	研究の背景と目的	61
3-3-2	材料および方法	61
3-3-3	結果	62
3-3-4	考察	64

3-4	第3章のまとめ	66
-----	---------------	----

第4章 水温履歴の解析と個体群解析 への応用 67

4-1	マダイ稚魚耳石断面からの水温履歴解析	67
4-1-1	研究の背景と目的	67
4-1-2	材料および方法	68
4-1-3	結果	71
4-1-4	考察	72

4-2	微量元素による日本海ヒラメの個体群解析の 試み	74
4-2-1	研究の背景と目的	74
4-2-2	材料および方法	74
4-2-4	考察	78

4-3	第4章のまとめ	81
-----	---------------	----

第5章 研究成果に対する考察 82

5-1	本研究の目的と結果	82
5-2	本研究の特色と残された課題	83
	文献	85

序

生物によって作られる硬組織の一部は、鉱物化していわゆる生物鉱物(バイオミネラル)を形成する。魚類においては体表の一部である鱗や平衡感覚や聴覚を司る耳石がその例である。こうした生物鉱物は、生物の誕生から死に至るまで蓄積形成されることから、生物の過去の履歴情報を刻み込んでいる場合がある。魚類の鱗の隆起線の乱れから生じる年輪から齢査定を行うことは、水産資源学の基礎的な解析手法である。また、Pannella (1971) によって魚類の耳石に刻まれた成長線が日周輪であることが明らかになって以来、多くの魚種で耳石日周輪による日齢査定が行われている。このように、魚類の生物鉱物である硬組織に注目した解析は、魚類の生態を解明するために有効な手法である。本研究においてはマダイを対象魚種としてその鱗と耳石から水温を中心とした履歴情報解析手法の確立を図るとともに、マダイ稚魚の鱗と耳石から水温履歴を解析した。

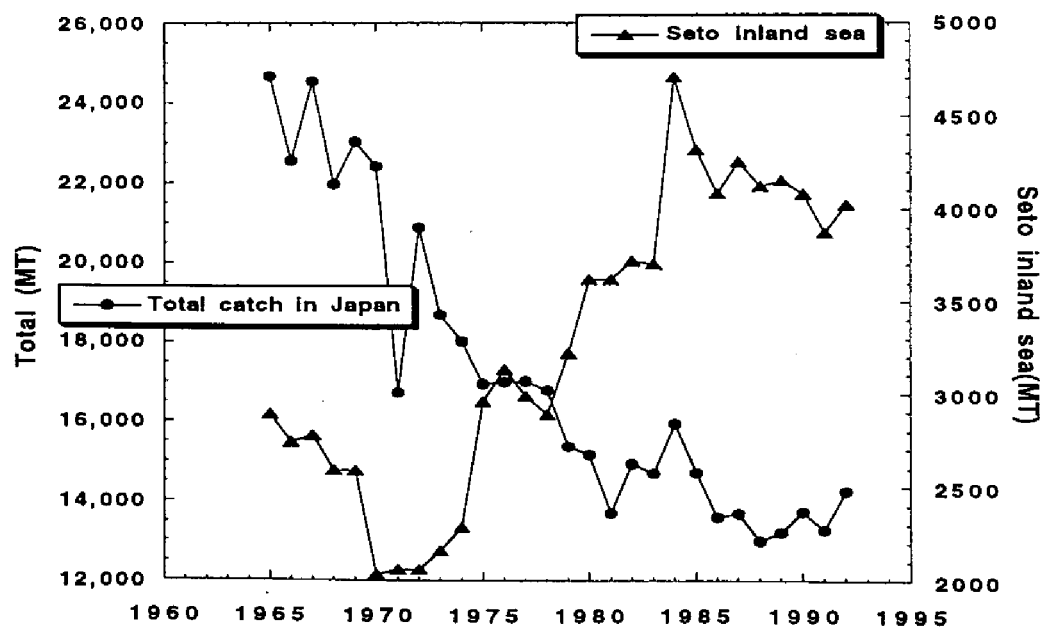


Fig.0-1. The catch of red sea bream.

マダイは我々日本人にとっては最もなじみの深い高級魚である。その漁獲量は全国的には近年漸減傾向にあるものの、瀬戸内海区では比較的安定した漁獲量を示している (Fig.0-1)。瀬戸内海では全長9cm未満のマダイの採捕及び所持販売が旧漁業法時代から禁止されており、漁業関係者におけるマダイ資源の保護・培養への意識には高いものがあつた。また、近年では積極的な資源の増大を図るための種苗の放流が全国各地で行われている。ちなみに平成4年の実績は、24府県で28,754千尾の放流のための種苗が生産され、32府

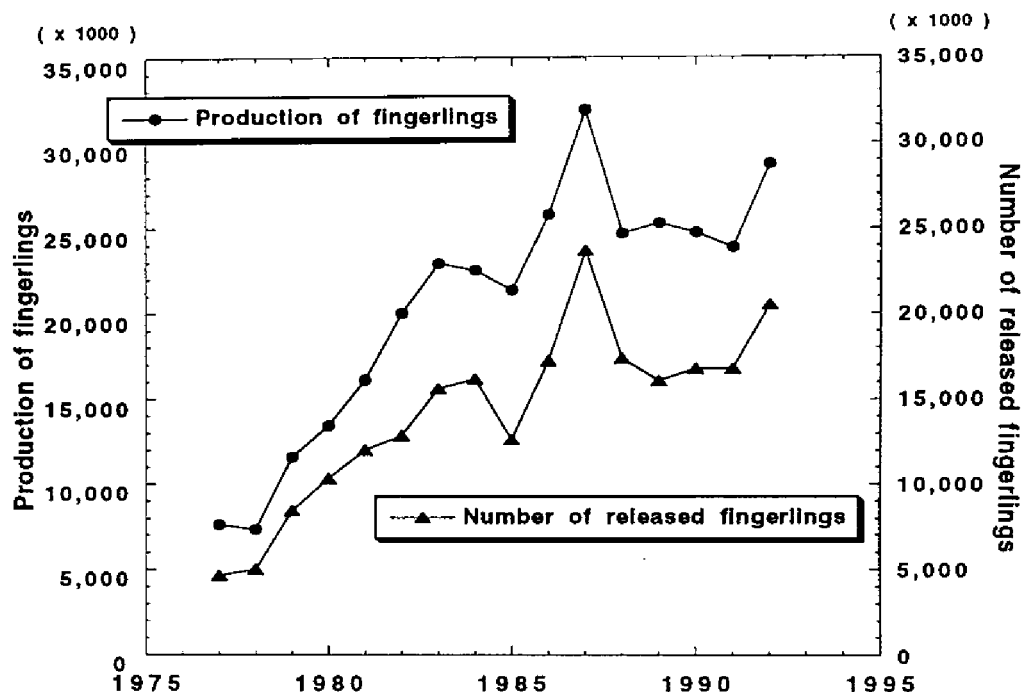


Fig.0-2. The number of fingerlings of red sea bream artificially produced and released.

県で20,558千尾の種苗が放流された (Fig.0-2)。現在、マダイの栽培漁業は試験研究の段階から徐々にではあるが実用化の段階へ移行しつつある。そのため種苗生産は県を主体とした第3セクターが行い、放流までの中間育成を地元の漁協が行うことが一般的になっている。すなわち、日本沿岸の津々浦々で

個体発生初期を人工的飼育環境下で過ごしたマダイ稚魚が大量に自然水域に放流されている。その放流箇所数は平成6年で716カ所にのぼり、様々な海域で人為的に管理された稚魚が毎年継続的に放流されている。放流されたマダイ資源を巡って現在ではいくつかの社会的問題も発生している。その中でも最も漁業者間で問題とされているのが、放流水域と再捕水域が必ずしも一致せず、放流した者が直接その利益を受けないという、費用負担の問題である。現在はまだどこで放流された個体群がどこで再捕されているかが必ずしも明確ではない。基本的にはそれぞれの放流個体群の生育履歴が判明すればこの問題も解決可能である。そのために行われているのが標識放流による追跡調査である。標識放流には大別すると負荷型と無負荷型がある。負荷型は一般的に行われているタグの装着やあるいは鰭カット、鰭抜去など、場合によっては魚体に深刻な負荷をかけてしまう方法である。一方、放流個体群の生育履歴を解析することが可能であれば、これを無負荷型の標識とみなすことが可能となり、これにより栽培漁業を進めるに当たっての前述した費用負担の問題の解決から、広くわが国の沿岸資源の的確な把握及び管理に大きく資することが期待できる。

本研究は、次の4章からなっている。第1章では、マダイ稚魚期の鱗の隆起線形成と水温との関係について解析した。第2章では、魚類耳石中の微量元素分析を行うための分析手法として導入したPIXEについて述べる。第3章では、耳石中の微量元素と水温との関係を解析した。第4章では、応用例として、マダイ稚魚個体の水温履歴解析およびヒラメ耳石の微量元素による個体群解析の試みを述べる。

謝辞

本研究をまとめるに当たって、ご指導、ご助言と原稿のご校閲を賜った京都大学大学院農学研究科教授 坂本 亘博士に厚く感謝の意を表します。

さらに、本研究の取りまとめに際し、有益なご助言をいただくとともに、原稿の校閲をいただいた京都大学大学院農学研究科教授 田中 克博士、同教授 林 勇夫博士に厚くお礼申し上げます。

本研究をすすめるに当たり、標本の提供、水温の計測など多大なご協力をいただいた社団法人日本栽培漁業協会、京都府立海洋センター、和歌山県水産試験場、大分県漁業公社並びに関係各県の方々にお礼申し上げます。また、マダイの飼育実験に際して的確なご助言をいただいた京都大学農学部附属水産実験所助手 青海忠久博士にお礼申し上げます。さらに、微量元素分析を行うに当たり、PIXE分析のご指導をいただいた理化学研究所 前田邦子博士、京都大学大学院エネルギー科学研究科教授 笠原三紀夫博士、京都大学大学院工学研究科助手 吉田紘二氏に厚くお礼申し上げます。同じく微量元素分析を行うに当たり、波長分散型EPMAの使用を快く許していただき指導していただいた京都府中小企業総合センターの松田 実氏に厚くお礼申し上げます。

最後に、本研究をまとめるに当たって、有益な議論と助言をいただいた京都大学大学院農学研究科応用生物科学専攻海洋生物資源学講座海洋生物環境学専攻分野(旧農学部水産学科水産物理学講座)の各位に心から感謝いたします。

第1章 マダイ鱗の解析

1-1 中間育成マダイ稚魚の鱗隆起線と水温の関係

1-1-1 研究の背景と目的

近年の環境と魚類行動との研究には二つの方向がある。一つはマイクロデータロガー、PTT、ピンガー等による負荷型の記録収集方法である。他の一つは個体内に継続的に蓄積形成される硬組織から環境履歴を読み取る試みで、いわゆる無負荷型と考えられる方法である。

硬骨魚類に形成される硬組織については、山田・麦谷 (1988) が次のように解説している。耳石と鱗は無機質、有機質、構造、形成過程において対照的な硬組織である。すなわち耳石は炭酸カルシウムが非コラーゲン性有機基質に沈着・形成される高度に石灰化した組織であるのに対して、鱗は骨芽細胞や繊維質芽細胞から分泌されるコラーゲン性有機基質にリン酸カルシウムが沈着した組織である。耳石や鱗の成長や石灰化に関する研究は、高等脊椎動物の骨や歯におけるほど進んではないものの、両者とも魚類の年齢形質として水産学上は重要な研究対象である。特に耳石については、Pannella (1971) によって耳石内部に刻まれた成長線が日周輪であることが明らかになって以来、多くの魚種で耳石の成長線を用いた日齢査定が行われている (Smith and Kostlan, 1991; Prince et al., 1991; Sweatman and Kohler, 1993; Townsend and Graham, 1981)。さらに、耳石に含まれる Sr, Zn, Fe, Mn 等の微量成分 (Gauldie et al., 1980; Townsend et al., 1989; Gauldie et al., 1986; Radtke, 1989; Kalish, 1989; Radtke et al., 1990; Townsend et al., 1992; Kalish, 1992; Secor, 1992; Gunn et al., 1992) や $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ 等の安定同位体比 (Devereux, 1967) と水温との関係から、個体が経験した過去の環境水温を推定する試みが行われている。

しかし、成長線の読みとり及び微量成分の定量分析は耳石の切断と精密な

研磨が不可欠なので、大量の試料を短時間で処理することは困難である。また、成長線が必ずしも日周輪を示さないこと (Campana and Neilson, 1985) や、耳石の主成分である炭酸カルシウムの結晶つまりアラゴナイト等の結晶の構造状態によっては読みとりが困難な場合がある。

一方、鱗の研究は、様々な魚類の年齢の推定や遡河性魚類の母川推定、あるいは魚類の成長の推定等、数多く行われてきた (安田, 1958; Bilton, 1974; Glenn and Mathias, 1985; Doyle et al., 1987)。Fisher and Pearey (1990) はギンザケの鱗の隆起線形成の研究から隆起線の間隔値から異なる個体群のギンザケの成長率を比較できることを示している。また、渡会・五十嵐 (1995) はシロザケの鱗隆起線の間隔値スペクトルから導き出した多変量解析から、平均 88% の正答率で母川を判別できることを示している。さらに、室内実験では、塩酸テトラサイクリン等の投与によって鱗に蛍光染色することができるため、これをタイムマーカーとした飼育実験が行われてきた (尾崎他, 1968)。また、近年ではアリザリン・コンプレキソンによるマダイ稚魚の鱗への大量標識の試みもなされている (中村・桑田, 1994)。更に放射化分析を用いたサマリウムやヨーロピウム等によるアクチバブルトレーサーの試みも行われている (Machibata, 1981; Machibata and Hori, 1981; 加藤, 1985)。年輪は、鱗表面に順次形成される規則正しい隆起線の縞模様が成熟や産卵等の生理的変化に伴って (安田, 1959) 乱れることにより形成される。また、Szedlmayer et al. (1991) は、*Cynoscion regalis* では標準体長 14.3mm~111.9mm の範囲内において、隆起線が 1 日 1 本の割合で形成しており、これより日齢が推定できることを示している。

このため、鱗の隆起線数や成長、水温から、隆起線数と水温との関係が解明できないかを調べた。この関係が明らかであれば、放流幼稚魚が経験する水温環境履歴が解明できる可能性があり、本研究の目的の一部が達成できる。本章では、鱗からの水温履歴情報抽出の可能性を検討するために、マダイ稚魚期の鱗の隆起線形成と水温との関係を検討した。また、地域的な成育の相違を比較することにより、水温環境履歴はさらに明確にできると思われたので、ほぼ同

じ時期に異なった3点を選定して実験を行った。

1-1-2 材料および方法

社団法人日本栽培漁業協会，京都府立海洋センターおよび財団法人京都府水産振興事業団の協力により，瀬戸内海西部海域に位置する伯方島及び百島の国営栽培漁業センター，並びに日本海西部海域に位置する宮津の京都府栽培漁業センターにおいて，種苗放流用として生産されたマダイ稚魚を供試魚とした。それぞれの位置を Fig.1-1-1 に示した。

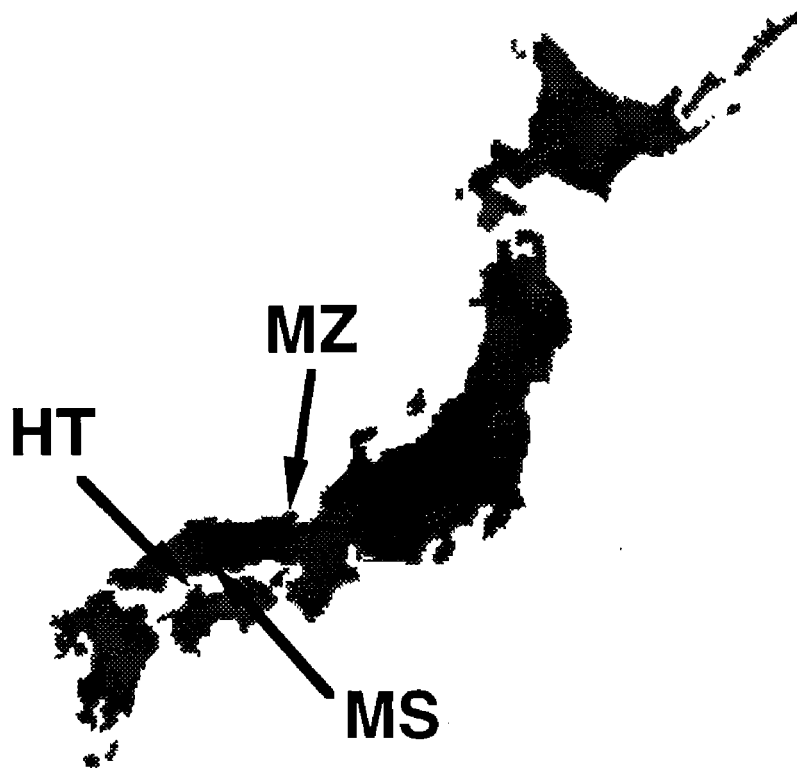


Fig.1-1-1. Experimental stations. Miyazu: MZ, Momoshima: MS, and Hakatajima: HT.

伯方島および百島では日本栽培漁業協会伯方島事業場の養成マダイを，宮津では京都府栽培漁業センターの養成マダイをそれぞれ親魚としている。

百島では約144m×約44m，水深約2mの廃止塩田において粗放的な種苗生

産が行われている。伯方島および宮津では、陸上タンクで20mm程度まで養成した稚魚を海面生け簀で放流に適したサイズまで中間育成する。

供試魚は百島ではふ化後19日目から、伯方島および宮津では中間育成を開始した日、すなわち伯方島では53日目、宮津では61日目から、それぞれ10日間隔をめぐりに一回30尾以上を採捕した。栽培漁業センターの業務の都合上、3海域同一日時の採捕は行えなかった。

供試魚の固定は無調整10%海水ホルマリンまたは70%エタノールを用いた。ホルマリンの場合、硬組織の脱灰 (Tucker and Chester, 1984) を防ぐため、研究室に持ち帰り流水で洗浄のあと、70%エタノールで保存した。

各個体の尾叉長を計測し、個体番号を付した上で、左側胸鰭裏付近の同一部位の鱗を5~6枚採取した。顕微鏡下で再生鱗でないことを確認し、スライドガラスおよびカバーガラスで固定した。採取したもののうち最も大きな鱗を顕微鏡の視野一杯になる拡大率で写真撮影した。隆起線の計測は、写真を肉眼で見て行った。隆起線の本数に鱗の縁辺部分として1を加えた値を隆起線数とした。

水温は超小型メモリー計測器 (MDS-T) を水面から1.5mに設置し20分または1時間間隔で測定した。観測期間は百島が1993年6月29日から8月5日、宮津が7月8日から8月11日、伯方島が7月1日から8月11日であった。計測器の測定範囲は0~30℃、精度は $\pm 0.15^{\circ}\text{C}$ ならびに時定数は2秒である (Sakamoto and Yuzuriha, 1993)。

1-1-3 結果

水温 水温は20分または1時間間隔のデータから一日の平均水温を算出した (Fig.1-1-2)。

百島の水温は、7月7日の24.7℃から急激に上昇し始め12日には28.9℃に達した。1日の平均水温が28℃を超える高水温状態が実験期間である6月29日から8月5日までの間に、7月11日から13日までの3日間続いた。7月12日以降、水温は27℃と28℃の間で変動した。

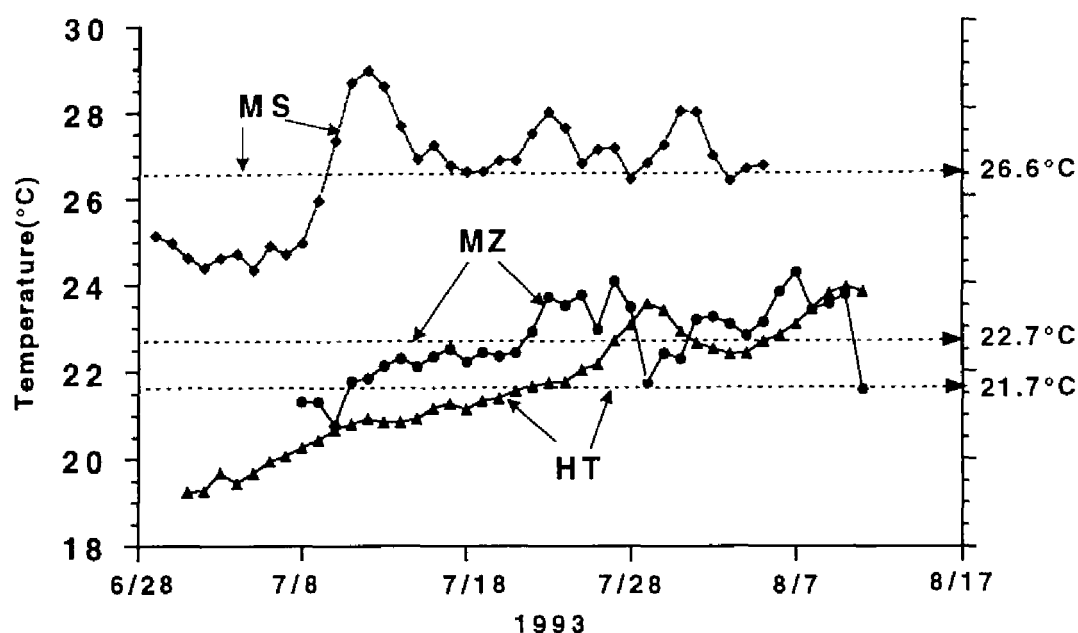


Fig.1-1-2. Daily mean temperature and total mean temperatures (dashed lines) in three stations. MS: Momoshima, MZ: Miyazu and HT: Hakatajima.

伯方島の水温は、実験開始の7月1日における19.2℃から7月26日の22.2℃にかけて、ほぼ直線的に上昇した。その後7月29日の23.6℃から8月3日にかけて低下したあと、再び実験終了の8月11日にかけて24℃近くまで上昇した。

宮津の水温は、実験開始の7月8日には21.3℃であり、これ以降7月27日の24.1℃になるまで上下しながらも上昇した。7月27日から7月29日の3日間で2.3℃低下したあと、上下を繰り返しながら8月7日まで上昇し、その後、実験終了の8月11日にかけて降雨のため低下した。

実験期間を通した平均水温は、百島で26.6℃、伯方島で21.7℃および宮津では22.7℃であった。

日齢と尾叉長 日齢と平均尾叉長との関係をFig.1-1-3に示す。平均尾叉長は各施設とも日齢に伴って直線的に増加していた。日齢と平均尾叉長との関係は高い相関を示し一次近似できたので、この回帰直線の傾きである一日当たりの尾叉長の増分、すなわち成長率を求めた。その結果、百島が1.08mm/dayで他の2施設における値、つまり伯方島の0.92mm/dayおよび宮津の

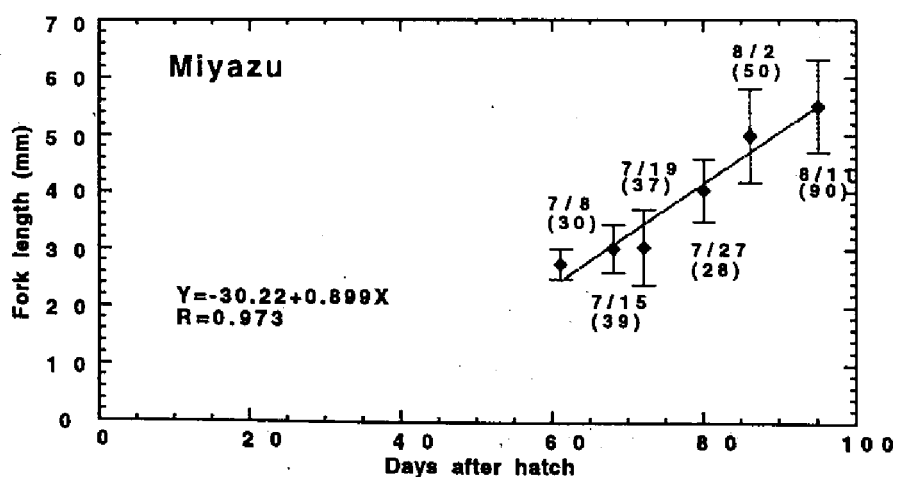
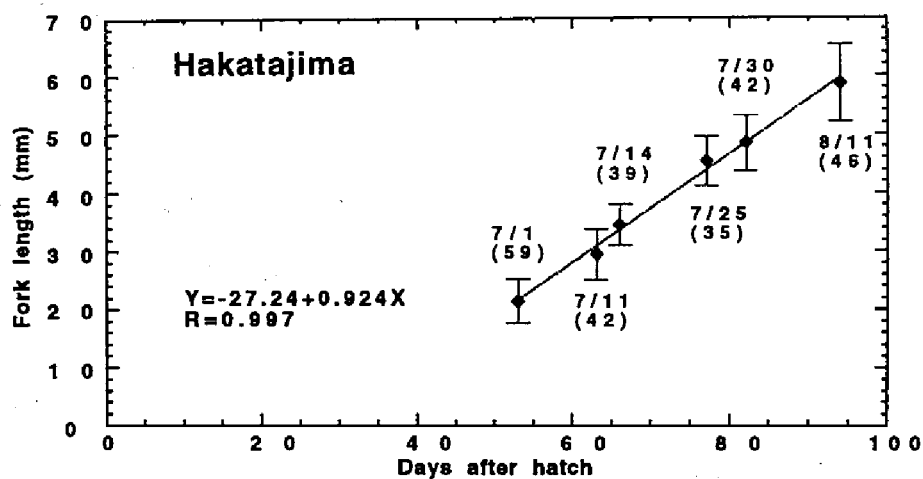
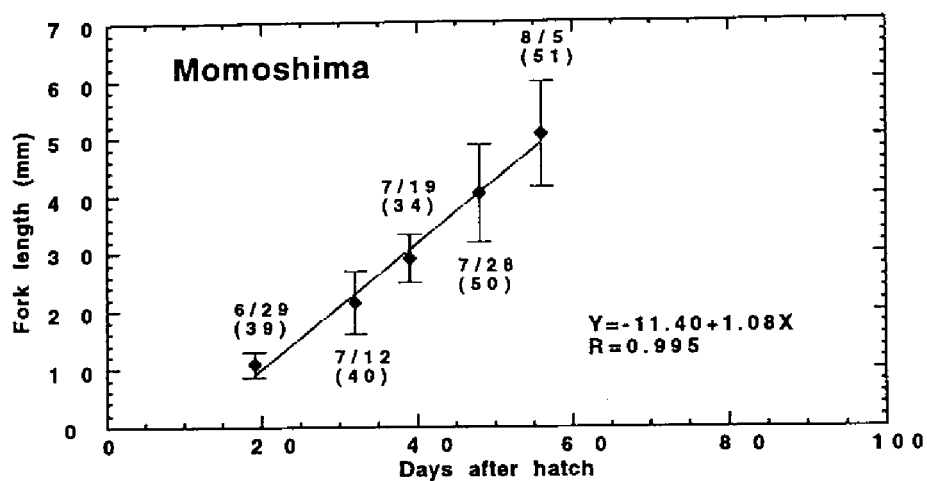


Fig.1-1-3. Correlations between days after hatch and fork lengths \pm S.D. Figures under or above error bars are the sampling date and the number of specimens.

0.90mm/dayと比べて大きいこと、および伯方島と宮津とはほぼ同程度であることが分かった。

日齢と隆起線 日齢と平均隆起線数との関係をFig.1-1-4に示す。尾叉長と同様に平均隆起線数は日齢とともに直線的に増加していた。この関係から最初に隆起線が形成された日齢を推定すると、百島では19日、伯方島では44日さらに宮津では48日となった。また、どの海区も日齢と平均隆起線数との回帰直線の相関係数が高いことから実験期間中、隆起線はほぼ一定の割合で形成されていたことが示唆される。すなわち百島では1.51本/day、伯方島では1.25本/day及び宮津では1.28本/dayであった。

尾叉長と隆起線 供試魚すべての尾叉長と隆起線数との関係をFig.1-1-5に示す。3施設ともに尾叉長と隆起線数との関係は直線的である。3施設の尾叉長と隆起線数との関係をみると、百島では1.35本/mm、伯方島では1.28本/mm、宮津では1.27本/mmとなり、百島が他の2海区より大きな値であることおよび伯方島と宮津とはほぼ同程度であることが明らかとなった。

1-1-4 考察

マダイ稚魚期の鱗に形成される隆起線は、実験期間中の平均値でみるとそれぞれの海域で百島では1.51本/day、伯方島では1.25本/day及び宮津では1.28本/dayとほぼ一定の割合で形成されていた。しかし、その割合はSzedlmayer et al. (1991) が *Cynoscion regalis* で示した1日1本のような日周期ではなく、また施設によってその割合が異なるため、マダイの稚魚の場合、隆起線から日齢を推定することはできない。しかし、稚魚の飼育施設によってほぼ一定の割合で隆起線形成が行われていることから、同一施設内でのマダイ稚魚の日齢は隆起線の本数から推定することが可能であるし、生息水温が何らかの方法で推定できれば、日齢を隆起線の本数で推定することも可能である。

隆起線の形成と、日齢及び尾叉長とには直線的な関係があり、かつ尾叉長

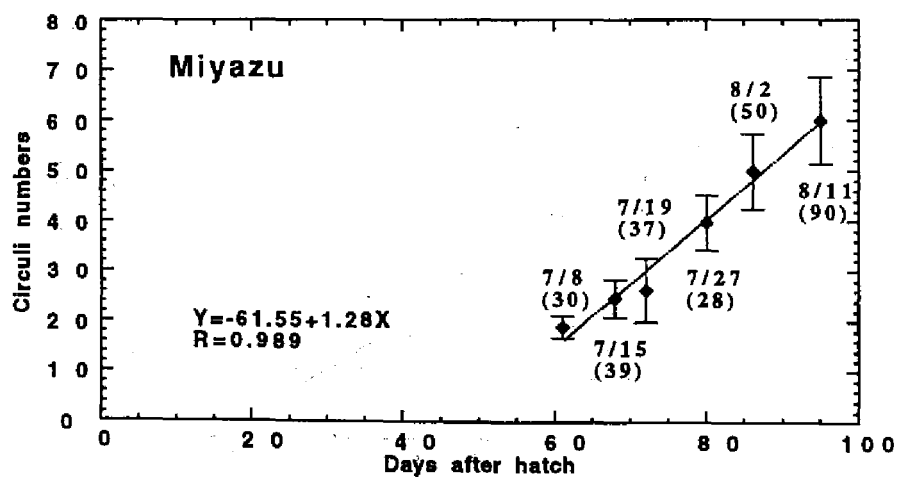
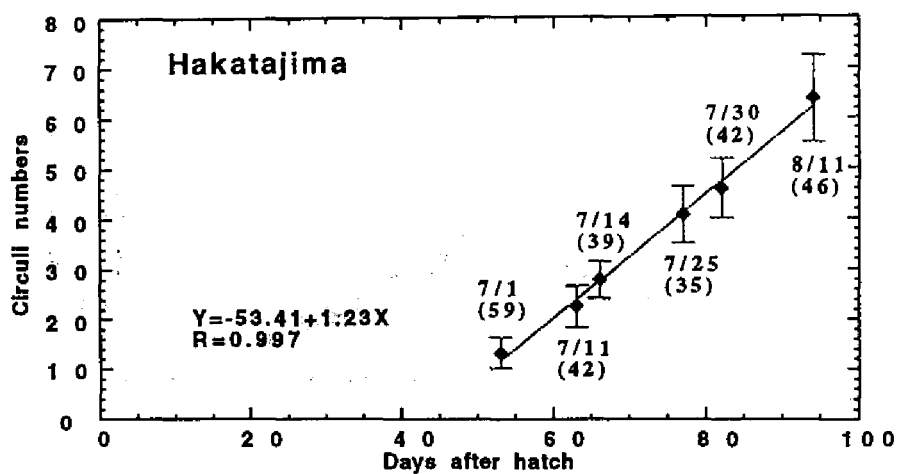
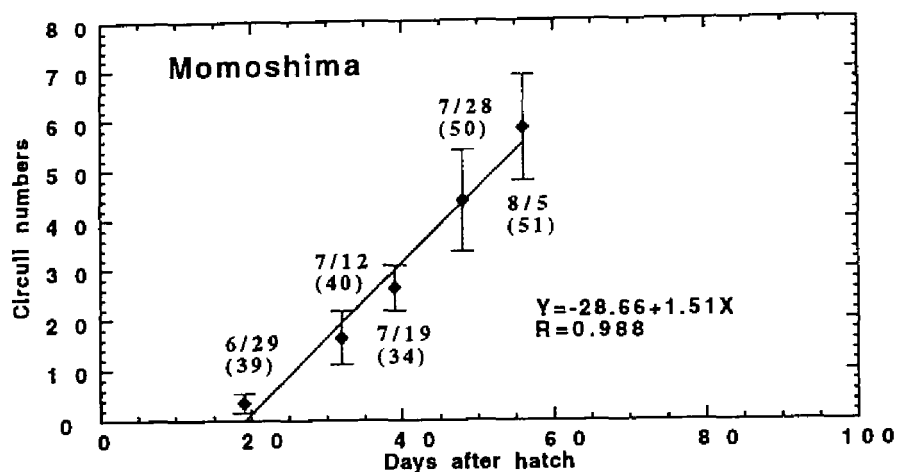


Fig.1-1-4. Relations between days after hatch and circuli numbers \pm S.D. Figures under or above error bars are the sampling date and the number of specimens.

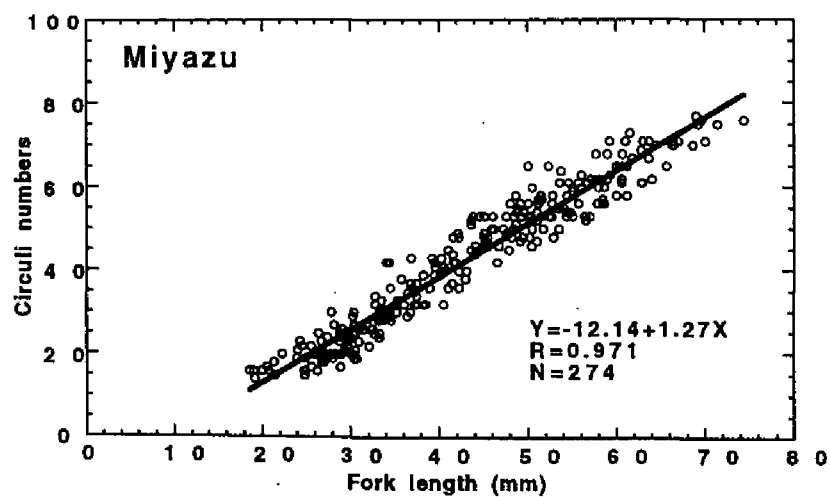
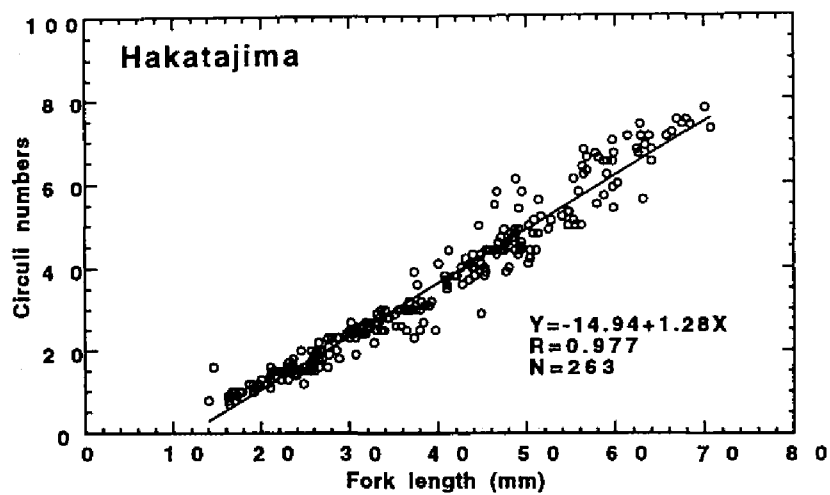
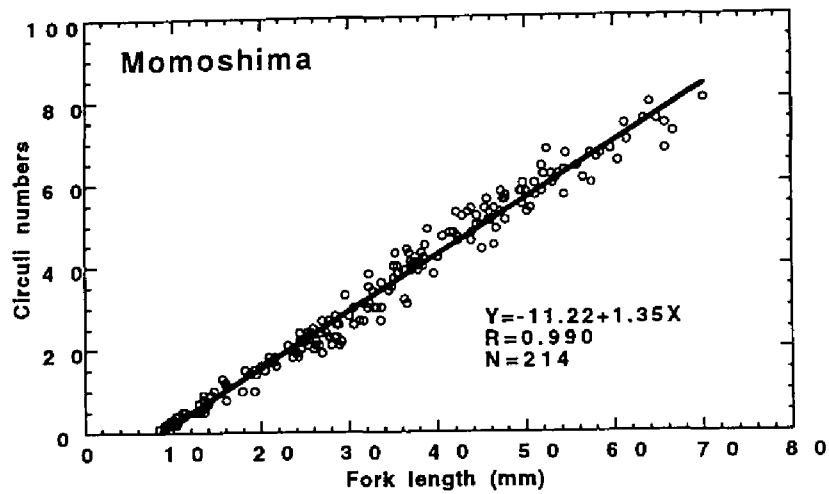


Fig.1-1-5. Correlation between fork length and circuli number measured in three different stations.

は日齢に伴ってほぼ直線的に増加していた。隆起線が鱗の表面に焦点を起点として鱗面積の拡大に伴って間欠的に形成される組織であることを鑑みると、マダイ稚魚期においては尾叉長の増加が隆起線の形成に関与していると考えられる。

尾叉長の増加の程度、換言すれば成長率の大小が鱗の形成及びそれに伴う隆起線の形成に影響を与えると仮定すると、隆起線にはその時々成長率が反映され、かつ刻み込まれていると考えることができる。

成長率に対して影響を与えている要因としては、水温、餌、親から受け継いだ性質等が考えられる。北島(1978)は、異なる水温条件で飼育したマダイ稚仔魚の成長から、環境条件や飼育管理が適正であれば、成長は水温によって規定されることを報告している。今回の実験では水温以外の環境条件および飼育管理に関して詳細な検討を行うことはできないが、水温と鱗の隆起線形成に関しては次のとおり指摘できる。すなわち実験期間中の平均水温が他の2施設に比べて高かった百島では成長率が高く、鱗隆起線の形成も他の2施設に比べて早かった。つまり最初に隆起線が形成された推定日齢が百島では19日目に対して、伯方島では44日目及び宮津では48日目であり、また一日当たりの隆起線数も百島が1.51本/dayに対して、伯方島では1.25本/dayおよび宮津では1.28本/dayとなっている。なお、これらの関係において、百島と伯方島が同じ親グループであるにも拘わらず、隆起線形成に違いが生じていることから、親の違いよりも水温等による影響がより大きく成長及び隆起線形成に関与していると考えられる。

1-2 マダイ稚魚期の飼育水温と鱗の隆起線形成との関係

1-2-1 研究の背景と目的

異なる中間育成施設で飼育されたマダイ稚魚の鱗隆起線形成が、飼育施設の水温と関係していることが明らかとなった。特に鱗隆起線の日当たりの形成本数は、稚魚の飼育水温が高いほど多くなる傾向が見られた。この関係を定量的に明らかにできれば単位時間当たりの隆起線数から生息水温の推定が可能となる。そこで、本章では、水温を一定に制御した飼育実験を通して飼育水温と鱗隆起線の形成を実験的に把握することを目的とした。

1-2-2 材料および方法

供試魚は、(株)関西総合環境センター宮津事業場で1994年4月14日にふ化し、同年5月26日に京都大学農学部附属水産実験所に搬入して飼育されたマダイを用いた。飼育実験は同水産実験所の室内水槽実験室において供試魚のふ化後119日目に当たる1994年8月11日から開始し、同8月19日に終了した。

実験水槽は、100 l ポリカーボネイト水槽を用いて自然水温区 (No.1)、26℃区 (No.2)、23℃区 (No.3)、20℃区 (No.4)、17℃区 (No.5) の5区を設けた。26℃区および23℃区は500 Wの冷却器をそれぞれ1台、20℃および17℃は同冷却器をそれぞれ2台用いて水温を調節した。飼育水は濾過海水を分水器でそれぞれの水槽に導き、一日当たり6回転の割合で注排水した。各水槽はそれぞれエアーストーンによる適度な通気を行った。各水槽の中央部分に設置したサーミスターの抵抗値を1時間間隔で24チャンネルのデジタルロガー (A&D 社) に記録し、後で抵抗値を水温に換算した。供試魚は各区それぞれ15尾ずつ収容した。収容に際して各水温区への水温馴化は行わなかったが、収容直後の弊死や異常な行動は認められなかった。実験開始時に病害予防のため、1 ppm エルバージュ溶液で薬浴した。餌は (株) ヒガシマルのひらめ配合飼料種苗5号を毎日午前8時、正午、午後5時の3回与えた。給餌は毎回水槽の底の残餌および排泄物をサイホンで取り除いた上

で、稚魚が飽食するまで数回に分けて行った。給餌量は毎回電子天秤で測定した。

実験開始時および終了時に麻酔を行った上で体重および尾叉長の測定を行った。
また、鱗は実験開始時には左側の胸鰭付近から、実験終了時には右側の胸鰭付近

Table 1-2-1. Total mean temperatures, feeding amount of diet through the experiment, body weight (BW) and fork length (FL) as of 11 August and 19 August 1994.

(Mean \pm S.D., N=15)						
	Temp. (°C)	Daily diet (g)	Start on 11 August		End on 19 August	
			BW(g)	FL(mm)	BW(g)	FL(mm)
No.1	28.9 \pm 0.5	17.1 \pm 3.3	17.9 \pm 3.1	91.6 \pm 5.4	23.5 \pm 4.3	99.3 \pm 5.8
No.2	25.8 \pm 0.2	13.5 \pm 3.1	18.3 \pm 3.4	90.2 \pm 5.0	23.0 \pm 5.0*	99.9 \pm 6.4*
No.3	23.0 \pm 0.2	11.3 \pm 2.0	18.0 \pm 3.3	90.8 \pm 5.6	22.5 \pm 5.3	99.1 \pm 7.4
No.4	19.2 \pm 0.4	7.6 \pm 1.4	18.5 \pm 3.4	91.1 \pm 5.7	20.6 \pm 4.9	95.8 \pm 6.4
No.5	16.6 \pm 0.3	5.4 \pm 2.0	20.1 \pm 3.0	93.7 \pm 6.0	21.7 \pm 3.8	97.1 \pm 5.3

* N=13

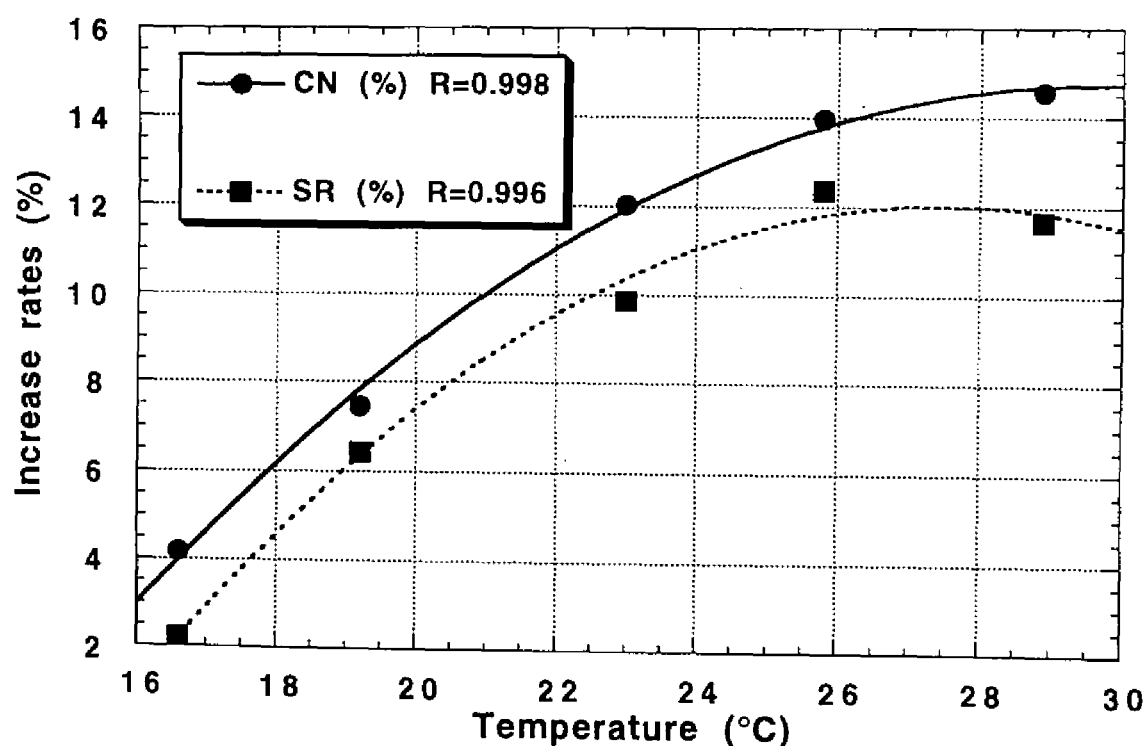


Fig.1-2-1. Correlation between seawater temperature (T) and increase rates of scale radii (SR) and circuli number (CN).

Regressions are fitted for parabolic curves as follows;

$$SR(\%) = -0.0830T^2 + 4.56T - 50.7 \quad (R=0.996)$$

$$CN(\%) = -0.0627T^2 + 3.73T - 40.6 \quad (R=0.998)$$

から5~6枚採取した。鱗は実体顕微鏡下で毛筆を用いて色素や汚れを取り除き、スライドガラスとカバーガラスで固定した。隆起線の観察は生物顕微鏡下で行った。鱗の計測は、採取した数枚の鱗の内、最も大きな鱗を選んで行った。鱗の中心から頭方向に被覆部の縁辺部までの距離をマイクロメーターで測定すると同時に隆起線数を計数した。隆起線数は、数えた隆起線の本数に鱗の縁辺部分として1を加えた値とした。

Table 1-2-2. Mean temperatures through the experiment, and scale radii (SR) and circuli number (CN) at the start and the end of the experiment, ie. on 11 August, and on 19 August 1994.

(Mean \pm S.D., N=15)

	Temp. (°C)	Start on 11 August		End on 19 August	
		SR(μ m)	CN	SR(μ m)	CN
No.1	28.9 \pm 0.5	1923 \pm 166	106.1 \pm 6.1	2147 \pm 116	121.6 \pm 5.9
No.2	25.8 \pm 0.2	1900 \pm 198* ¹	105.4 \pm 13.1* ¹	2135 \pm 178* ²	120.2 \pm 8.1* ²
No.3	23.0 \pm 0.2	1917 \pm 161	106.4 \pm 7.6	2106 \pm 195	119.2 \pm 8.0
No.4	19.2 \pm 0.4	1910 \pm 169* ³	107.3 \pm 8.1* ³	2033 \pm 167	115.3 \pm 7.9
No.5	16.6 \pm 0.3	2052 \pm 93* ⁴	113.1 \pm 6.8* ⁴	2098 \pm 96	117.8 \pm 5.5

*¹ N=12

*² N=13

*³ N=14

*⁴ N=13

1-2-3 結果

実験期間中の平均水温、平均日間給餌量、実験開始時および終了時の尾叉長並びに体重を Table 1-2-1 に示す。実験期間中、実験室の入口近くの No.2 から、8月17日未明に飛び出た2尾以外は、病害の発生等の異常は認められなかった。平均水温は設定した水温近傍のほぼ一定の値で推移した。なお、No.1は特段水温調整を行わなかったが実験期間中はほぼ一定の水温であった。平均日間給餌量はほぼ水温に比例して増えた。

各水温区のマダイ稚魚の成長を比較するために、尾叉長および体重の増加量を実験開始時のそれぞれの値で除した値を成長率 (%) として求めた (Fig.1-2-1)。体

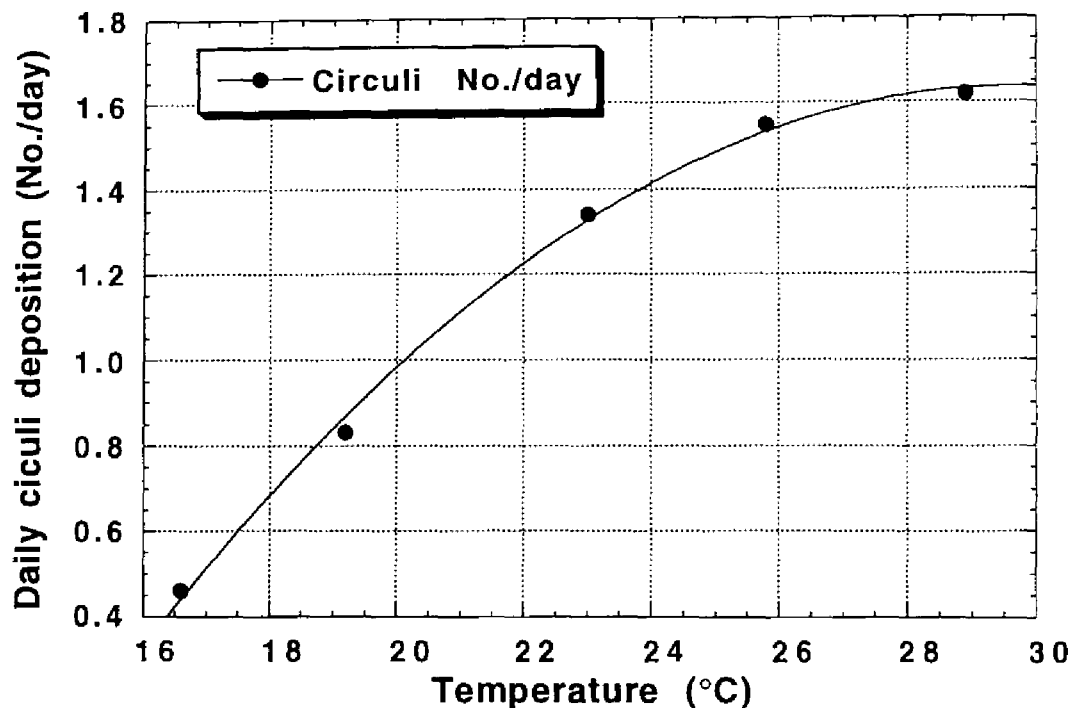


Fig.1-2-2. Correlation between seawater temperatures (T) and daily circuli deposition (No./day) in the experimental condition. The regression is fitted for a parabolic curve as follows; $\text{No./day} = -0.00707T^2 + 0.418T - 4.56$ ($R=0.999$).

重増加率は水温とはほぼ比例し、最も水温の高いNo.1が最も体重の増加が大きかった。一方、尾叉長の増加率はNo.2の25.8℃で最も高い値を示し、最高水温区のNo.1ではむしろ23.0℃のNo.3と同じ程度であった。

鱗径および隆起線数をTable 1-2-2に示す。No.2, No.4およびNo.5区には実験開始時に採取した鱗全てが再生鱗である個体があったので、その個体は解析の対象外とした。飼育開始時に測定した平均隆起線と飼育終了時に測定した平均隆起線の差から平均隆起線の増加量を求めた。この平均隆起線数の増加量を飼育日数で除した値、すなわち実験期間中の一日当たりの隆起線の平均的な形成本数を求め、水温に対してプロットしたところ、放物線で回帰することができた (Fig.1-2-2)。また、近似式は $\text{No./day} = -0.00707T^2 + 0.418T - 4.56$ (T: Temperature) で、その相関係数は0.999と高い値であった。

1-2-4 考察

北島 (1978) は、マダイの種苗生産に関する詳細な研究の中で、稚魚期において環境条件や飼育条件が適正であれば、成長は水温によって規定されると述べている。また、田中 (1993) は志々伎湾で採集した天然マダイの稚魚との比較で飼育魚を 14.2℃区、17.4℃区、20.1℃区及び 21.0℃区で飼育した結果、天然仔魚が低水温下で飼育魚よりも成長がよい傾向があるものの、飼育魚では 21.0℃の成長が早いことを述べている。今回の実験で設定した約 17℃～29℃の水温範囲は、種苗生産施設でマダイがふ化から中間育成を経て放流されるまでに経験する水温を概ねカバーしていると考えられる。こうした水温条件下においては Table 1-2-1 で示したとおり、給餌量は水温とともに直線的に増加する。ただし、残餌量は測定していないので、摂餌量は求められない。しかし、実験期間中、水温が 20℃以下の実験区ではマダイは常時水槽の底に留まっており、まれに横臥行動 (山岡, 1993) のような状態を示す個体もあった。一方、23℃以上の高い水温区では、常時水槽内を遊泳していた。このように水温によってマダイ稚魚の行動の活発さに大きな違いが見られた。これは、マダイ稚魚のエネルギー配分、すなわち運動エネルギー、基礎代謝および成長への配分に水温が関係しているためと考えられる。

水温と投餌量との関係から摂餌量は水温に比例して増加していることが推察できる (Table 1-2-1)。しかし、水温と体重の増加および尾叉長の増加との関係には相違が見られる。体重は水温の増加とともに最高水温にいたるまで増加を示しているが、尾叉長については 26℃付近を極大値として、29℃では増加率は減少している (Fig.1-2-2)。26℃を超える水温で頭打ちになるのは、水温と心拍数との関係 (光永, 1997) にも見られることから、水温が一定限度を超えると成長に障害が生じる可能性を示唆している。

第 1 章 1-1 において、異なる 3 カ所の栽培漁業センターで生産・中間育成されたマダイ稚魚の鱗の隆起線に水温履歴が刻まれている可能性を見いだした。すなわち平均水温が高い海域では成長が早く、それに応じて鱗の隆起線形成も促進される。1-1 の結果から平均水温に対するマダイ稚魚の一日当たりの鱗隆起線の形成本数を引用すると、平均水温 26.6℃で 1.51 本/日、22.7℃で 1.28 本/日、21.7℃

で1.25本/日である。これらの値と飼育実験の結果を合わせてプロットすると、飼育水温と一日当たりの隆起線の形成本数との回帰曲線の近傍にすべて位置することが分かる (Fig. 1-2-3)。すなわち、稚魚が経験した平均水温は、鱗の隆起線の日当たりの形成本数を測定することで推定することが可能である。

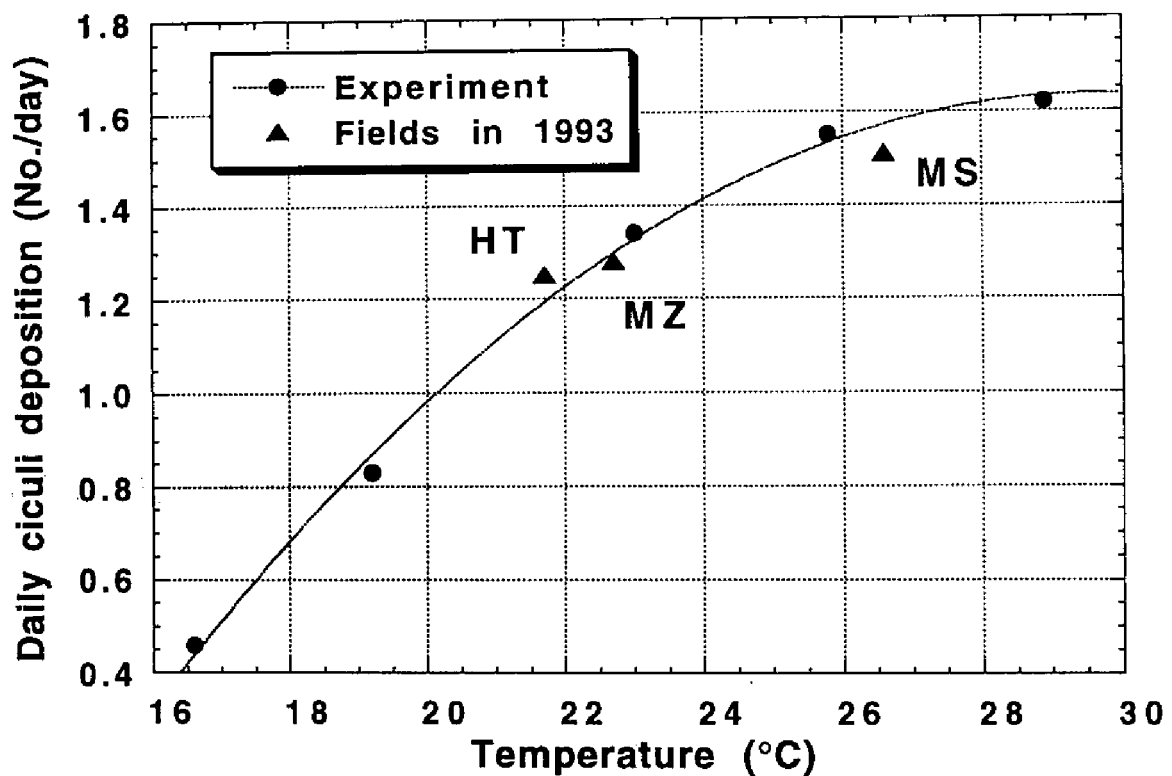


Fig.1-2-3. Correlation between seawater temperatures and daily circuli deposition in the experimental condition and field data in 1993, MS: Momoshima, HT: Hakatajima, and MZ: Miyazu.

1-3 マダイ稚魚の鱗隆起線と水温変動

1-3-1 研究の背景と目的

飼育実験および異なる水温条件の栽培漁業センターにおける中間育成中のマダイ稚魚の鱗隆起線の形成が飼育・生息水温に関係することが明らかになった。一方、戸嶋ら (1995) は、マダイ成魚の鱗の解析から、対馬暖流域の青森から長崎に至る海域間で、第1輪径組成に3つのタイプがあることを報告している。このことから、日本列島周辺では同じ親から生まれた放流種苗もそれぞれの放流海域の水温環境によって、隆起線形成が相違するのと同時に、輪径にも差異が生じている可能性がある。このため本章では、水温環境と隆起線形成の経年的な変動を求めるとともに、新たに鱗径を計測しその成長と水温との関係を求めた。また、天然マダイ稚魚と沿岸の水温変動との関係を検討することを目的とした。

1-3-2 材料および方法

供試魚は、1993年、1994年および1995年に社団法人日本栽培漁業協会（日裁協）、京都府、和歌山県、長崎県および大分県漁業公社の協力を得て、種苗放流用のマダイ稚魚と天然マダイ稚魚を入手した (Fig.1-3-1, Table 1-3-1)。放流用の稚魚についてはそれぞれ以下の場所で中間育成されていた。日裁協伯方島事業場地先網生け簀、日裁協百島分場の廃止塩田を利用した飼育池、京都府立海洋センター地先網生け簀、和歌山県下の串本および加太漁業協同組合地先網生け簀並びに大分県漁業公社上浦事業場地先網生け簀である。また、天然稚魚はそれぞれ以下の場所および漁法で漁獲された。京都府下浜詰に設置された大型定置網および長崎県下松浦漁業協同組合地先でのイワシ船びき網と平戸市志々伎湾奥での試験操業である。70%エタノールで保存した供試魚は、尾叉長の計測の後、左側胸鰭裏付近の同一部位の鱗を採取し、スライドグラスおよびカバーグラスで固定した。

鱗の計測は第1章1-2と同様に生物顕微鏡下で行った。隆起線の本数を計測するとともに、1994年および1995年のサンプルについては、鱗の中心から頭方向

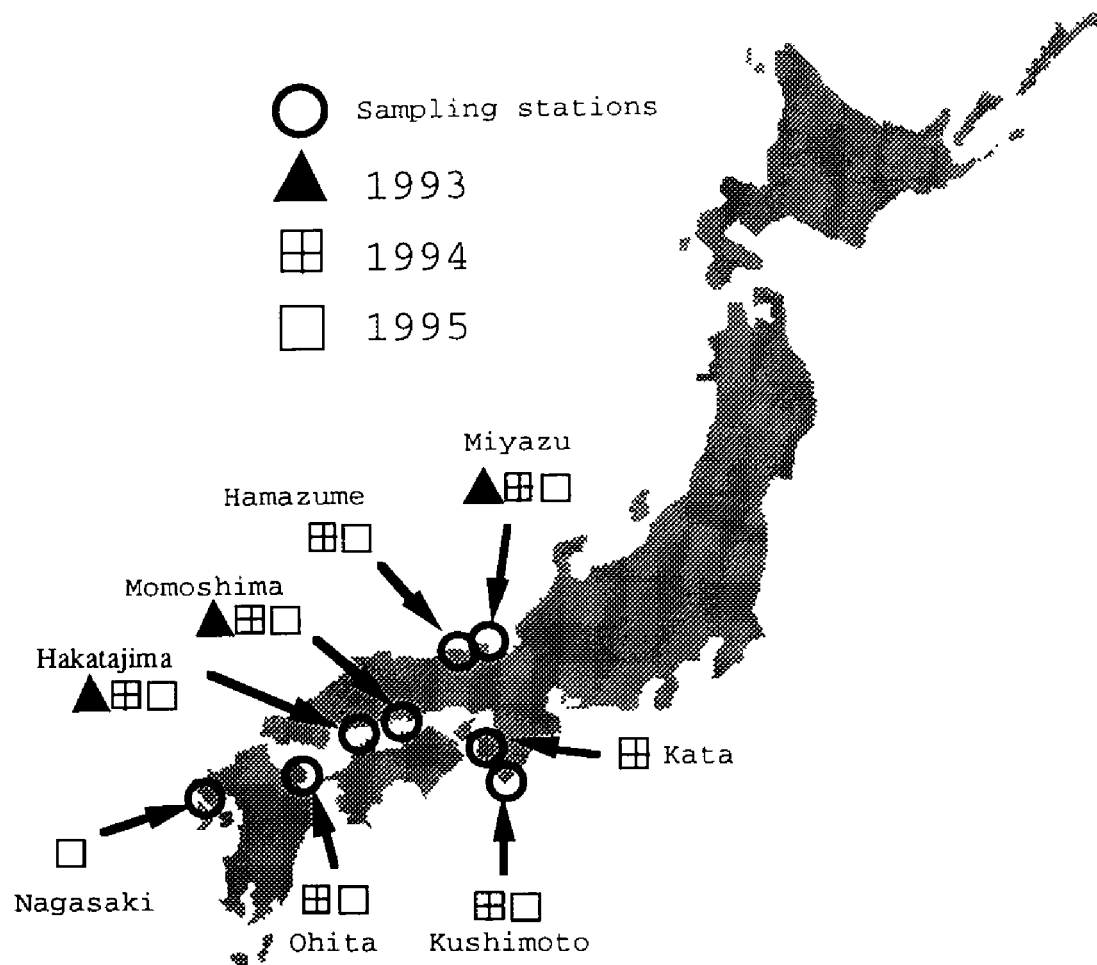


Fig.1-3-1. Sampling stations of red sea bream juveniles in 1993, 1994, and 1995.

に被覆部の縁辺部までの長さ（鱗径）を測定した。

水温は提供を受けたマダイ稚魚を中間育成した網生け簀内の水深1.5mにMDS-Tを設置して測定した。長崎については、試験操業を行った平戸市志々伎湾奥の養殖筏の水深1.5mにMDS-Tを設置した。また、浜詰および串本については京都府立海洋センターと和歌山県水産試験場の測定値を利用した。得られたデータより1日の平均値を求めて解析に使用した。

1-3-3 結果

実験期間中の各海域の水温変動を Fig.1-3-2 に、各海域の実験期間中の平均水

Table 1-3-1. Sampling stations, date, days after hatch, sample number, and fork length (FL)±SD in 1993, 1994, and 1995.

(Units: days and mm)

Station	Date	Days after hatch	Sample number	FL±SD
Miyazu	8 July 1993	61	30	27.56±2.25
	15 July 1993	68	39	30.27±4.16
	19 July 1993	72	37	30.44±6.50
	27 July 1993	80	28	40.44±5.42
	2 August 1993	86	50	49.99±8.14
	11 August 1993	95	90	55.06±8.06
Momoshima	29 June 1993	19	39	10.88±2.17
	12 July 1993	32	40	21.51±5.43
	19 July 1993	39	34	29.13±4.17
	28 July 1993	48	50	40.31±8.47
	5 August 1993	56	51	5.50±9.15
Hakatajima	1 July 1993	53	59	21.52±3.88
	11 July 1993	63	42	29.59±4.35
	14 July 1993	66	39	34.64±3.46
	24 July 1993	77	35	45.41±4.22
	29 July 1993	82	42	48.52±4.74
	11 August 1993	94	46	58.77±6.53
Miyazu	15 July 1994	65	56	33.0±5.4
	21 July 1994	83	62	41.4±4.7
	2 August 1994	83	51	58.4±5.4
	8 August 1994	89	38	71.7±4.5
Kushimoto	13 May 1994	49	52	27.9±2.8
	23 May 1994	59	66	32.6±4.0
	3 June 1994	70	78	41.8±4.6
	13 June 1994	80	45	49.7±4.6
	23 June 1994	90	54	53.7±7.0
	4 July 1994	101	48	63.2±7.5
Kata	4 July 1994	41	40	20.0±5.4
	16 July 1994	53	30	32.4±5.0
	26 July 1994	63	40	44.8±6.1
	6 August 1994	74	41	51.1±5.8
	23 August 1994	91	39	64.8±8.7

Table 1-3-1. (continued)

Momoshima	1 July 1994	27	57	15.8±4.0
	5 July 1994	31	42	20.7±4.5
	14 July 1994	40	63	24.8±4.8
	18 July 1994	44	30	29.1±5.9
	30 July 1994	56	49	42.4±5.3
	8 August 1994	65	53	50.9±6.0
Hakatajima	14 June 1994	51	82	22.0±2.6
	20 June 1994	57	68	27.5±3.2
	2 July 1994	69	67	35.3±7.7
	10 July 1994	77	40	42.7±4.5
	18 July 1994	85	42	48.3±7.2
	24 July 1994	91	52	54.9±6.2
	31 July 1994	98	40	62.9±4.3
Ohita	22 June 1994	49	62	20.5±2.7
	2 July 1994	59	49	23.1±3.1
	13 July 1994	70	42	39.2±4.1
	18 July 1994	75	41	41.0±4.1
Hamazume ^{*1}	28 June 1994	0 ^{*2}	33	42.0±36
	27 July 1994	29 ^{*2}	39	65.4±6.2
	2 August 1994	35 ^{*2}	42	65.9±5.9
	4 August 1994	37 ^{*2}	40	67.4±5.9
Kushimoto	20 June 1995	61	24	36.8±1.7
	30 June 1995	71	18	45.5±2.6
	10 July 1995	81	22	53.6±3.9
	20 July 1995	91	21	58.0±4.0
	26 July 1995	97	18	66.4±9.3
Momoshima	26 June 1995	21	30	18.3±1.1
	30 June 1995	25	30	24.2±1.2
	10 July 1995	35	30	34.9±2.2
	19 July 1995	44	30	50.6±3.5
Hakatajima	8 July 1995	65	30	40.8±2.1
	18 July 1995	75	30	48.2±2.7
	29 July 1995	86	30	58.7±2.9
	3 August 1995	91	30	63.5±5.9
	9 August 1995	97	30	67.1±5.4

Table 1-3-1. (continued)

Oita	16 June 1995	40	30	13.2±1.6
	26 June 1995	50	30	18.9±1.6
	6 June 1995	60	30	26.5±2.5
	17 July 1995	71	30	37.5±5.9
Hamazume ^{*3}	30 June 1995	0 ^{*4}	30	38.5±5.1
	5 July 1995	5 ^{*4}	12	40.7±6.0
	1 August 1995	32 ^{*4}	11	58.2±5.7
Nagasaki ^{*5}	25 June 1995	0 ^{*6}	30	36.3±4.4
	18 July 1995	23 ^{*6}	30	53.7±4.4
	10 August 1995	46 ^{*6}	30	66.9±4.8

*1 Wild juveniles.

*2 Days after 28 June.

*3 Wild juveniles.

*4 Days after 30 June.

*5 Wild juveniles.

*6 Days after 25 June.

Table 1-3-2. Mean seawater temperatures, standard deviations, maximum and minimum temperatures throughout experimental periods in 1993, 1994, and 1995.

(Units:°C)					
1993	Periods	Mean temp.	SD	Max.	Min.
Miyazu	8 Jul.-11 Aug.	22.7	0.9	24.3	20.8
Momoshima	29 Jun.-5 Aug.	26.6	1.3	28.9	24.3
Hakatajima	1 Jul.-11 Aug.	21.7	1.3	19.2	23.9
1994	Periods	Mean temp.	SD	Max.	Min.
Miyazu	15 Jul.-8 Aug.	28.5	0.8	2.9	26.6
Kushimoto	23 May-4 Jul.	21.7	1.0	24.2	20.0
Kata	9 Jul.-23 Aug.	26.7	1.0	28.1	23.8
Momoshima	1 Jul.-8 Aug.	31.0	1.5	32.8	27.0
Hakatajima	14 Jun.-31 Jul.	22.2	2.0	25.5	18.9
Oita	22 Jun.-18 Jul.	23.4	1.1	25.9	20.9
Hamazume	28 Jun.-4 Aug.	22.5	1.6	26.3	19.7
1995	Periods	Mean temp.	SD	Max.	Min.
Kushimoto	21 Jun.-26 Jul.	21.3	1.2	23.8	19.1
Momoshima	26 Jun.-19 Jul.	27.2	1.6	29.7	24.4
Hakatajima	8 Jul.-8 Aug.	22.5	1.1	24.2	20.7
Oita	16 Jun.-17 Jul.	21.7	1.2	24.3	20.2
Hamazume	1 Jul.-31 Jul.	23.5	1.5	26.5	20.9
Nagasaki	18 Ju.-10 Aug.	25.1	1.1	31.7	23.3

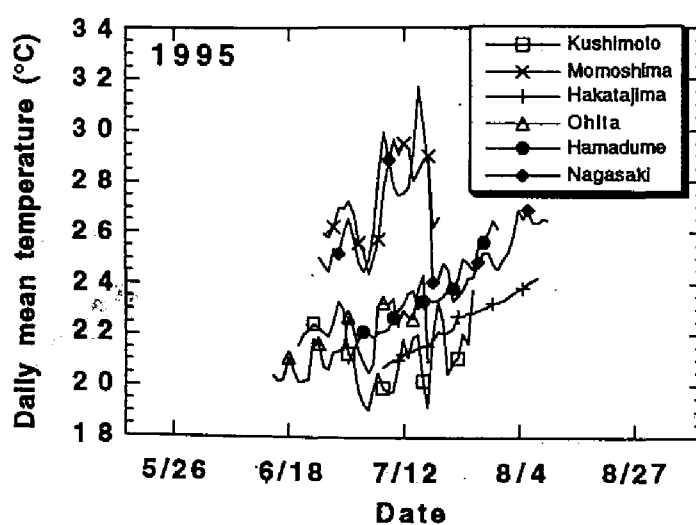
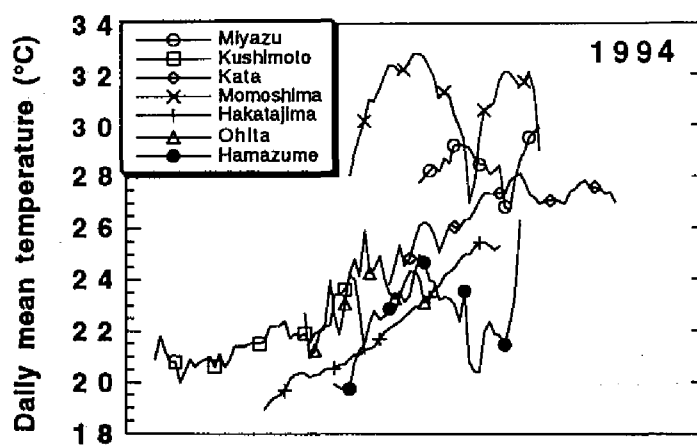
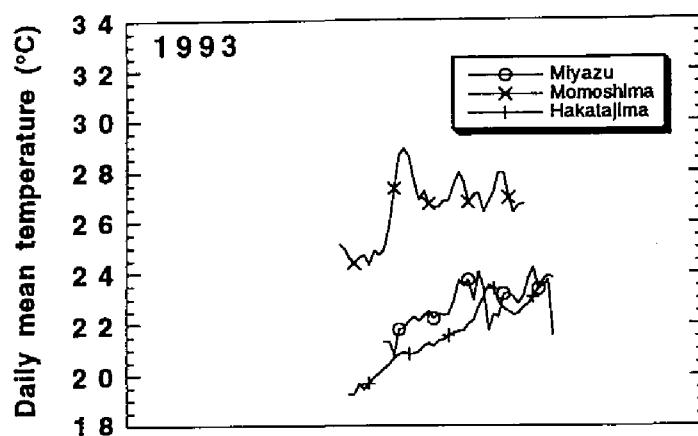


Fig.1-3-2. Time series of temperature fluctuation of 1993, 1994, and 1995.

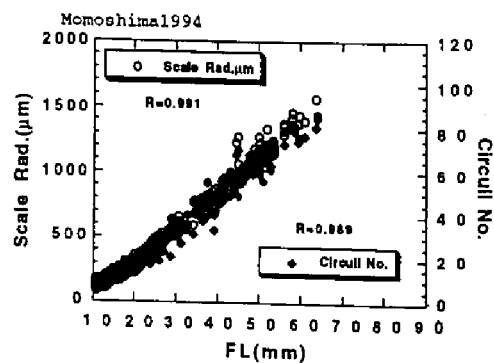
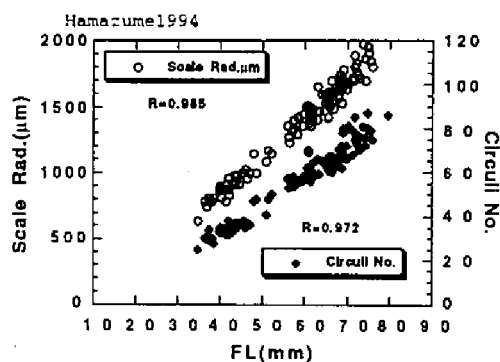
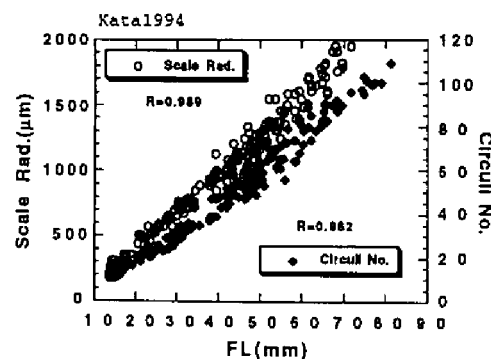
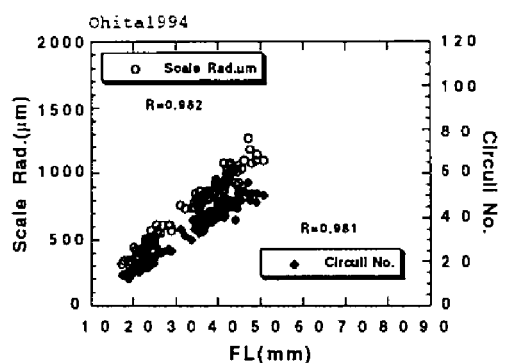
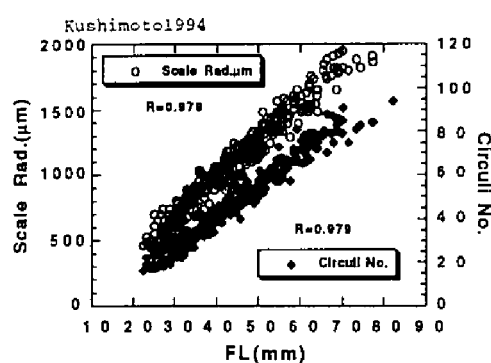
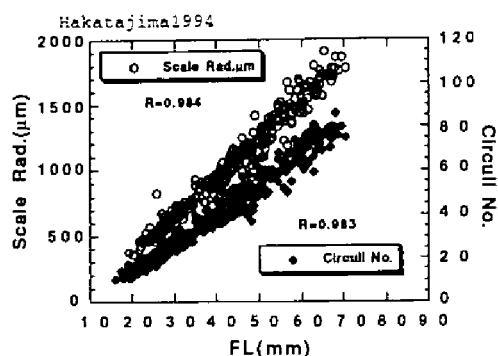
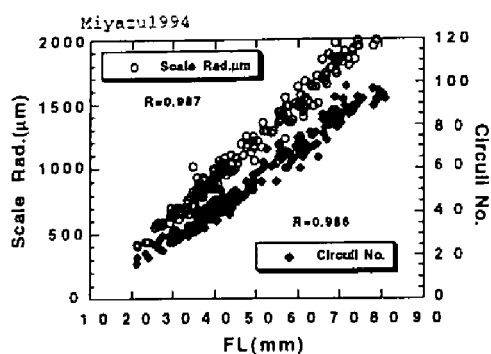


Fig.1-3-3a. Relationship between red sea bream fork length vs. scale radius and circuli number in 1994.

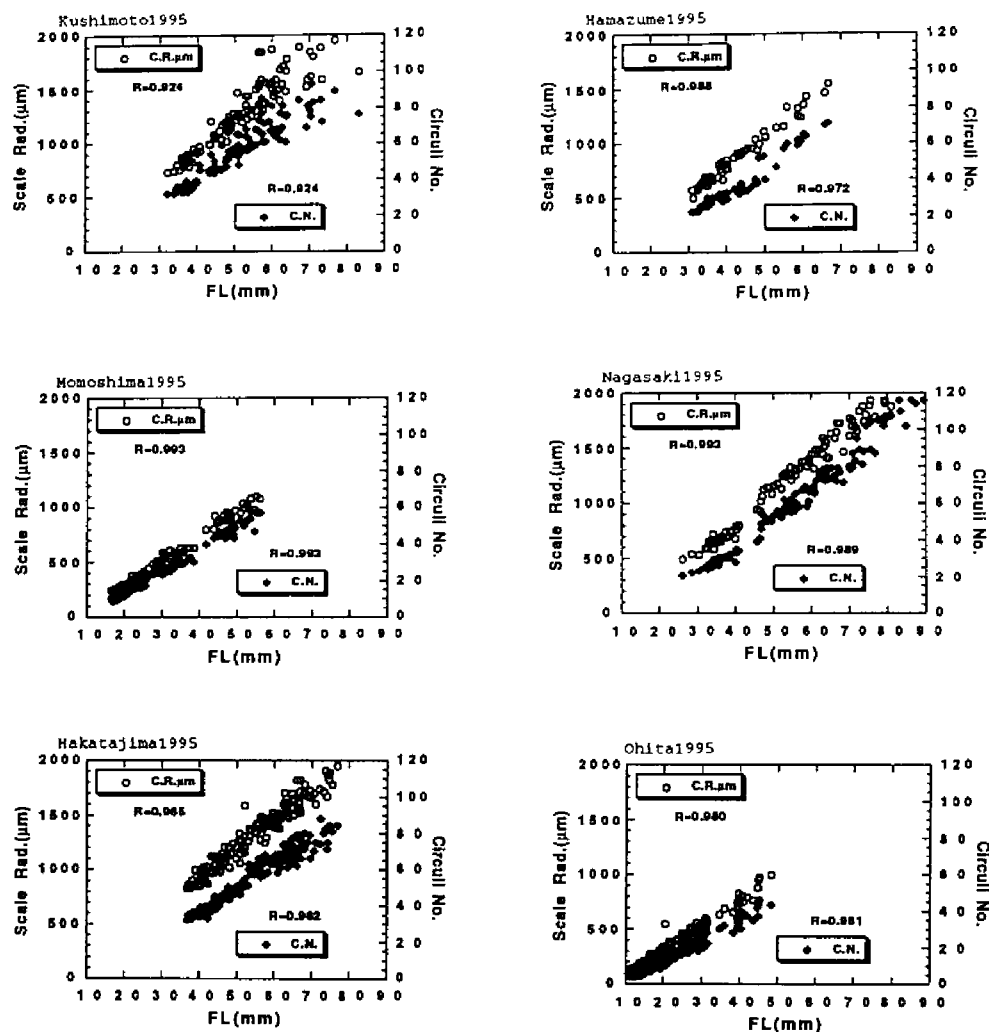


Fig.1-3-3b. Relationships between red sea bream fork length vs. scale radius and circuli number at 6 different locations in 1995.

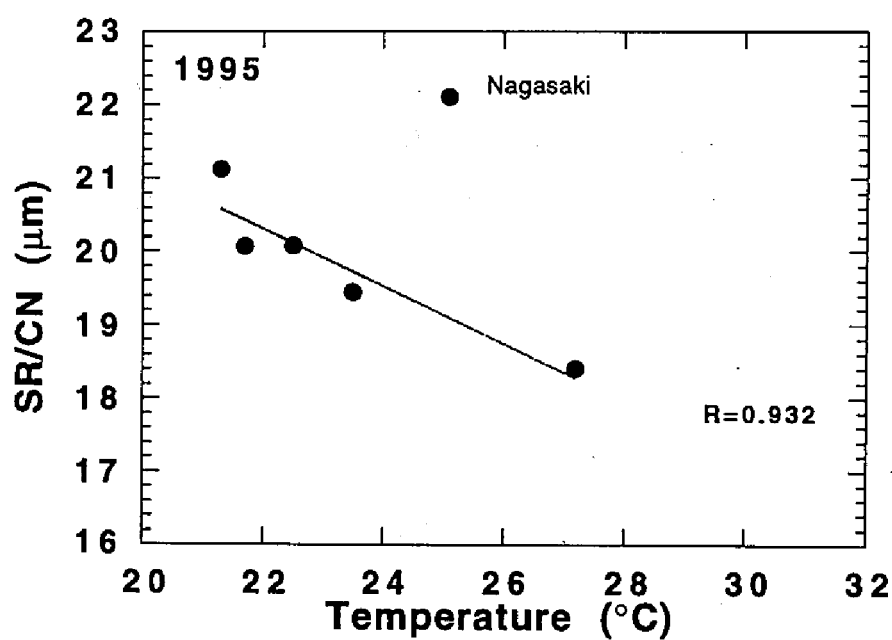
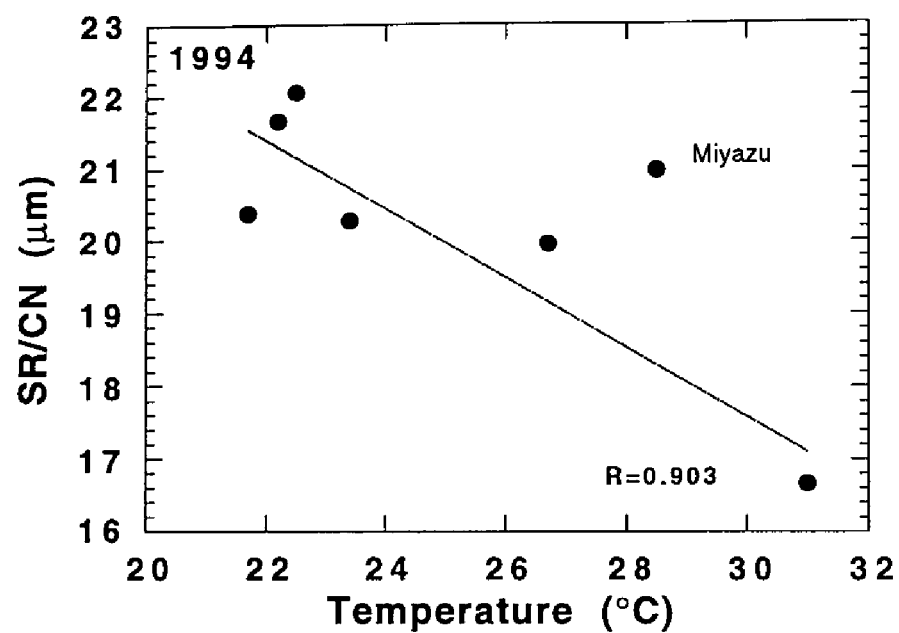


Fig.1-3-4. Relationship between temperature and SR/CN in 1994 and 1995. Solid circle represents each sampling station.

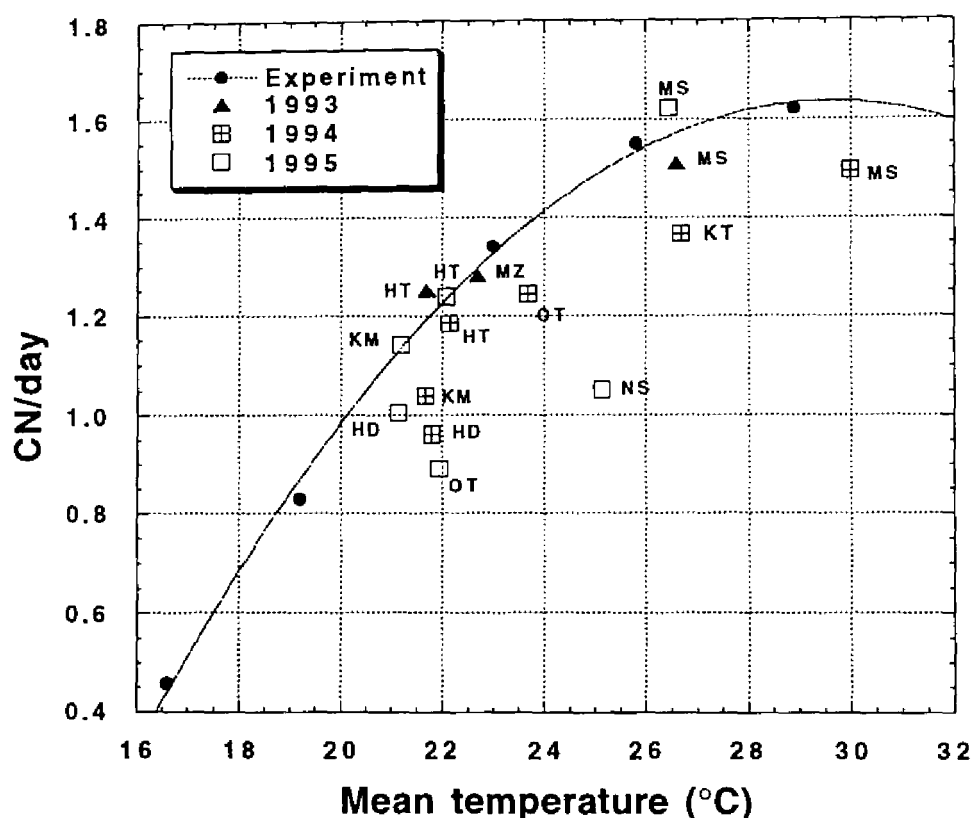


Fig.1-3-5. Relationship between water temperature and circuli formation rate, CN/day.
Miyazu: MZ, Kushimoto: KM, Kata: KT, Momoshima: MS, Hakatajima: HT, Ohita: OT,
Hamazume: HD, and Nagasaki: NS.
Solid circles with dotted curve indicate the experimental result shown in Fig. 1-2-2.

温を Table 1-3-2 に示す。1993 年は冷夏で 1994 年は猛暑であった。このため、両年の平均水温の差が宮津では 5.8℃、百島では 4.4℃と大きな値を示したものの、伯方島では 0.5℃の差に留まっている。また、水温変動については、百島は 3 カ年ともに実験期間中 2～5℃の水温の上下が 2～3 回繰り返されるのが観測されたが、伯方島では 3 カ年とも実験期間を通じて単調な水温上昇を示した。宮津については、1993、1994 年ともに百島ほどではないが、実験期間中、水温の上下が見られた。浜詰の平均水温は 1995 年が前年に比べて 1℃高かった。また、浜詰の水温変動は、1995 年は実験期間中を通して単調に上昇しているのに対して、1994 年は実験当初は単調に上昇しているものの、7 月中旬頃から下降に転じた後、8 月上旬に上昇に転じている。この傾向は近接する宮津の水温変動に対応している。

1994, 1995 年の尾叉長と鱗径との関係および尾叉長と隆起線数との関係を Fig.1-3-3 に示す. 両年および各海域ともに相関係数 0.9 以上で直線で回帰することができた. この回帰直線の傾き, すなわち SR/FL と CN/FL から隆起線の間隔値である SR/CN を求め, 平均水温に対してプロットした図を Fig.1-3-4 に示す. 1994 年の宮津と 1995 年の長崎を除くと, 両年とも平均水温と隆起線の間隔には有意な負の相関があった (1994 年: $F=17.761$, $P=0.0135$, 1995 年: $F=19.901$, $P=0.0210$). 隆起線数とふ化後の経過日数との関係から, 一日あたりに形成される隆起線数を求め, この値を実験期間中の平均水温に対してプロットした (Fig.1-3-5). なお, ふ化日を特定できない浜詰 1994, 1995 および長崎 1995 の天然魚については, 最初に採取されたサンプルを 0 日目として, その後の経過日数で隆起線数の増加本数を除した値を用いた. 回帰分析の結果, 上に凸な二次曲線で回帰できることが分かった ($R=0.832$, $F=11.284$, $P=0.0027$). なお, 宮津 1994 は, 平均水温 28.4°C に対して 2.28 本/日と上記の関係を大きく逸脱した値を示した.

1-3-4 考察

マダイの稚魚の中間育成場の水温環境は, 年によって変動があるものの, その地形等によってある程度, 特徴付けられている. 1993 年から 3 カ年の水温データがある百島と伯方島を比べると, 廃止塩田を利用した百島の施設では, 平均水温が他の施設に比べて $2\sim 5^{\circ}\text{C}$ 程度高い. そして水温の上下の変動が激しい. 一方, 海峡に隣接した海域に中間育成施設を有する伯方島では初夏から盛夏にかけての海水昇温傾向しかあらわれないため, 水温の激しい変動は殆ど見られず, 中間育成の期間を通じて単調に水温が上昇していく. 稚魚期のマダイの成長が水温で規定されるならば, こうした中間育成施設の空間規模や飼育水の取り入れ方法によって水温変動の幅や平均水温に差が生じ, マダイの成長に大きな影響を与えることになる.

一方, Fig.1-3-3 の結果から, 鱗径や隆起線は尾叉長によって規定されていると考えられるから, 結果的に中間育成施設の水温変動は鱗径や隆起線に刻まれるこ

となる。Fig. 1-3-4 で示したとおり、稚魚期のマダイの鱗に形成される隆起線の平均的な間隔値は、水温とともに減少していく。また、その関係は、

1994 年が

$$SR/CN (\mu m) = 31.89 - 0.48T (^{\circ}C) (R=0.903, P=0.014),$$

1995 年が

$$SR/CN (\mu m) = 28.90 - 0.39T (^{\circ}C) (R=0.932, P=0.021)$$

で強い相関が見られる。

これらの回帰直線から大きくはずれた1994年の宮津と1995年の長崎のサンプルについて、検討を加える。1994年の宮津のサンプルは、京都府立海洋センターから提供を受けたものであるが、このマダイ稚魚は、同センターが定置網の網目選択性の実験用として実験用の生け簀で継続的に飼育していたものである。サンプルは、マダイの成長段階ごとに繰り返し行われた網目の選択実験の際に、すくいとられた稚魚の一部を本研究用として提供を受けた。このため、提供を受けたサンプルはその時点で選択的に成長のよい大きな稚魚に偏っていた可能性がある。このことは、一日当たりの隆起線形成本数が2.28本と他のサンプルに比べて異常に多いことから裏付けられる (Fig. 1-3-5)。

長崎のサンプルは、曳網で漁獲された天然稚魚である。一方、水温を計測したのは志々伎湾奥の養殖筏の水深1.5m地点である。この地点の水温変動は、Fig. 1-3-2 で示したとおり、大きく上下に変動しており、最高水温も31.7℃と百島の29.7℃を大きく上回っている。しかし、志々伎湾において7月から8月にマダイ稚魚が主として餌をとる湾中央部の底層 (畔田ら, 1980) の周年の水温変動は、12℃～26℃の範囲 (Sudo and Azeta, 1996) で特に7月から8月にかけては20℃～25℃であることから、試験操業で得られた稚魚が実際に生息していた地点での平均水温は、Table 1-3-2 で示した25.1℃よりも低く、Fig.1-3-4 から予測される20℃前後であったと考えられる。このことは、Fig. 1-3-5 で示した一日当たりの隆起線の形成本数と水温との関係からも推定できる。

Fig. 1-3-5 は1993, 1994, 1995年の平均水温と一日当たりの隆起線数の形成本

数との関係に、水温を制御した飼育実験の結果を重ねてプロットしたものである。この図より、ほとんどの点は、飼育実験の回帰曲線の下側にプロットされている。すなわち、飼育実験は、設定された一定の水温において、飽食という餌条件で飼育していることから、その水温での最大の成長を示していると考えることができる。実際の海域では Fig. 1-3-2 で示したとおり海域によって水温は激しく変動している。このような水温条件の下では、その海域の平均水温で期待される最大の成長には至らないと考えられる。

1-4 第1章のまとめ

1) 中間育成マダイ稚魚の鱗隆起線と水温との関係においては、一日当たりの隆起線の形成本数と水温、隆起線数とふ化後の日数とに直線で回帰できる関係があることが分かった。

2) 尾叉長と隆起線数との関係から、相互の関係を見ると、1.35本/mmから1.27本/mmの間であることが示された。

3) 飼育水温を一定とし5段階に分けて飼育を行い、鱗の輪径の増加率(SR)と隆起線数(CN)との関係を明らかにした。一定水温に対するCN、SRについてそれぞれ次の関係を見い出した。

$$SR = -0.0830T^2 + 4.56T - 50.7 \quad (R=0.996) \cdots \cdots 1-1)$$

$$CN = -0.0627T^2 + 3.73T - 40.6 \quad (R=0.998) \cdots \cdots 1-2)$$

4) 一日当たりの隆起線数と水温との関係は次式で表せた。

$$\text{No./day} = -0.00707T^2 + 0.418T - 4.56 \quad (R=0.999) \cdots \cdots 1-3)$$

5) マダイ稚魚の鱗隆起線数と水温変動を水温については実測値を、マダイ稚魚については天然魚及び異なった沿岸域の中間育成施設で得られた個体について式1-3)より推定することを試みた。

6) 推定値はほとんど回帰曲線の下側に示されたが、これは水温一定、飽食投餌という条件より悪い環境で生息していることによると考えられた。しかし、式1-3)より鱗隆起線を用いて環境水温を推定することが可能であることが明らかとなった。

第2章 PIXEによる魚類耳石中微量元素分析

2-1 研究の背景と目的

海洋生物の硬組織の多くは炭酸カルシウムを主成分としている (Ichii and Mugiya, 1963). マダイの耳石はほぼ純粋な炭酸カルシウムのアラゴナイトの結晶である. この結晶中には主成分であるカルシウムの他に微量元素としてストロンチウム, 亜鉛, 鉄, マンガン等が含まれている. しかし, その含有量は極めて微量であり, かつ, 耳石自体, 大変小さな器官である. このためその分析には高度なテクニックを必要とする.

従来, 魚類耳石の微量元素分析の手法としては, EPMA(Electron Probe Micro Analysis)が用いられてきた. EPMAは走査型電子顕微鏡(SEM)にX線検出器を装着したもので, 検出器のタイプによって, エネルギー分散型EPMA(SEM-EDX)と波長分散型EPMA(SEM-WDX)に分けられる. Gunn et al. (1992)は, EPMAによる魚類耳石の微量元素分析に際しての技術的な問題を詳細に解説している. それぞれの検出限界については, SEM-EDXでは5000ppm以上, SEM-WDXでは数100ppm以上の濃度でないと定量分析が困難であることを示している.

一方, Sie and Thresher(1992)の先駆的な研究の結果, PIXE(Particle Induced X-ray Emission: 荷電粒子励起X線分析)を用いることで, 魚類耳石中の数ppm以下の極微量な元素の定量が可能であることが明らかとなっている. このように, 高度に石灰化した炭酸カルシウムの結晶である耳石中に主元素のカルシウム以外の微量元素が含まれるのは, 必須元素としてカルシウムが取り込まれる際の生体の元素取り込みの機能が環境要因に深く関係しているためと考えられる. また, 耳石の石灰化は鱗や骨に比べて遅いが着実に成長を継続する. さらに, 鱗や骨に入ってカルシウムは回転代謝するが, 耳石に一旦沈着したカルシウムは安定している (麦谷, 1994). このように, 耳石は履歴情

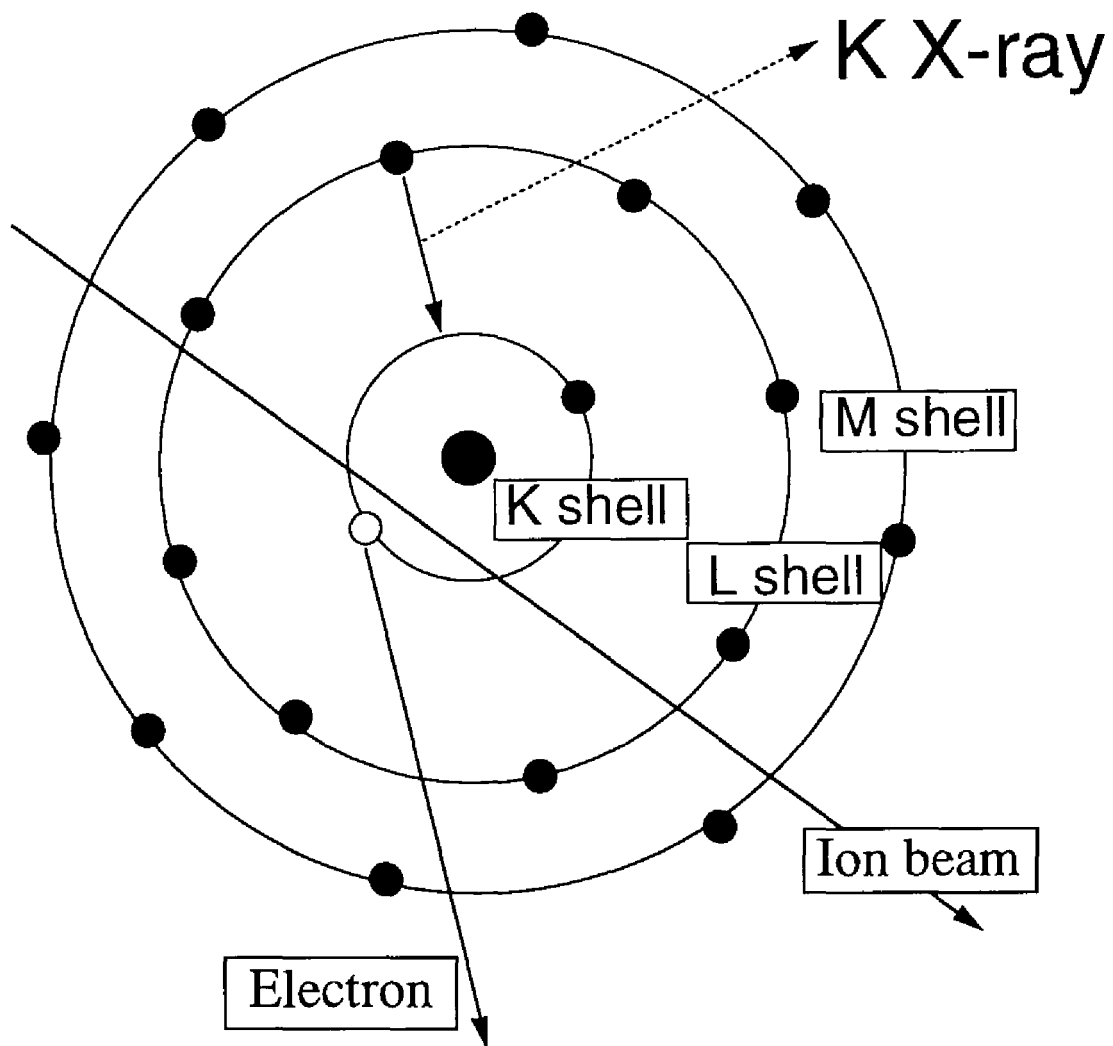


Fig. 2-1. Schematic illustration of inner-shell vacancy creation and subsequent X-ray emission due to ion beam bombardment.

報を解析するに当たり，優れた特長を有している。

本章では，魚類耳石等の炭酸カルシウムを主成分とした硬組織の微量元素分析手法としてPIXEを導入することとし，その測定手法を開発した。

2-2 PIXE の原理と特長

加速器を用い高いエネルギーに加速してイオンを試料に照射すると、試料中の原子の内殻電子が電離する。その後、電離した内殻電子の空孔に外殻電子が遷移する。このとき、内殻電子と外殻電子の軌道のエネルギー順位の差に相当するエネルギーがX線又はオージェ電子の放出によって解放される (Fig.2-1)。このX線は、この原子に固有なエネルギーを有しているので、このエネルギーを測定することによって原子の種類が分かる。このX線を特性X線という。また、特性X線の発生量は原子の濃度に比例するのでこの特性X線の収量を計測することで、濃度が分かる (Johansson and Campbell, 1988)。K殻空孔をL殻電子が埋めた時に発生するX線は $K\alpha$ 、K殻空孔をM殻やN殻の電子が埋めた時に発生するX線は $K\beta$ と呼ばれている。

PIXEでは一般的な分析では加速イオンとしてプロトン (H^+) を用いるが、特別な場合には、その目的に応じた重イオンを用いることもある (Horino et al., 1992)。イオンを励起源とすることで内殻電子の電離確率が電子線励起に比べて2桁も大きい。また、エネルギー分散型の検出器で測定した場合の主たるバックグラウンドである二次電子の制動放射による連続X線 (Bremsstrahlung production) が桁違いに小さい。このように原理的にPIXEはEPMAに比べて絶対的にも相対的にも優れた感度を有している。

さらに、加速イオンを大気中に取り出して測定 (In-air PIXE) することも可能である。In-air PIXEは試料調整に際して分割が許されない考古学試料や美術試料等の大型の試料や水分を含んだ生物試料等のそのままの測定が可能である。また、イオンの照射による試料への電荷の集積 (Charge-build-up) がほとんどないので、Charge-build-upを防ぐための試料への炭素膜などの導電体のコーティングが不要である。

2-3 PIXEによる定量分析

試料中に含まれる元素Xの濃度 C_x は、半導体検出器 (Si(Li)) で測定した特性X線のスペクトルから得られるピーク面積、すなわち元素XのX線強度 I_x を求めることで決定される。 I_x は、 T_0 は、Si(Li)検出器の窓や空気(In-

$$I_x = n_p \Omega \epsilon_x C_x T_a \int_{E_p}^0 \sigma_p(E) \frac{dE}{S(E)} T(E) \quad \dots 2-1)$$

1)----- 2)-----

ここで,

$$T(E) = \exp \left[-\mu \frac{\cos \theta_i}{\cos \theta_0} \left(\int_{E_p}^E \frac{dE'}{S(E')} \right) \right]$$

n_p : 試料に照射されるプロトンの数 Ω : 検出器に対する立体角
 T_a : X線吸収体による透過率 ϵ_x : 検出器の効率
 $\sigma_p(E)$: プロトンのエネルギーEの時のX線発生断面積
 E_p : プロトンの入射エネルギー μ : 線吸収係数
 $S(E)$: 阻止能 θ_i : イオンビームと試料面の法線のなす角
 θ_0 : 試料面法線とX線取出方向のなす角

air PIXE の場合) による吸収因子を含み以下のように定義される.

2-1) 中の下線部 1) は, 分析する試料が厚いために照射したイオン (プロトン) が試料中でエネルギーを失うためにX線発生断面積が変化することを示している. 2-1) 中の下線部 2) は, プロトンの進入した距離に応じてその地点で発生するX線が試料によって自己吸収される様子を示している. 2-1) 中の I_x は実験より得られ, C_x 以外は測定条件やデータベースから求められるので, 元素濃度 C_x を定量することができる.

しかし, 実際の測定では検出器の立体角 Ω やプロトンの数 n_p を正確に測定することは困難であり, これらの誤差がそのまま定量分析の誤差に含まれてしまう. このため, これらの寄与をできる限り減らし, 元素濃度 C_x を求めるために, 次のような工夫を行う. ここで 2-1) を簡単に表すために C_x と n_p と

$$I_x = \Omega n_p C_x M_x \quad \dots 2-2)$$

ここで,

$$M = \epsilon_x T_a \int_{E_p}^0 \sigma_p(E) \frac{dE}{S(E)} T(E)$$

Ω 以外の因子を M (濃度校正係数) で表す.

M_x は主成分元素の組成によって決まる．すなわちマトリックスの組成が似かよっていれば， M_x は同一であると近似して良い．さらに I_x, I_y, C_x について次の

$$\frac{I_x}{I_y} = \frac{\Omega n_p C_x M_x}{\Omega n_p C_y M_y} \quad \dots 2-3)$$

$$C_x = \frac{C_y I_x M_y}{I_y M_x} \quad \dots 2-4)$$

ように定義する．

ここで試料に既知濃度の元素Yをドーブするか，あるいは試料中の一元素Yの濃度を別の方法でもとめておく．その濃度を C_y ，得られたピーク強度を I_y とすると，式2-3となり，2-4)から求める元素の濃度 C_x を求めることができる．しかし，硬組織を非破壊で分析する際にはこうした既知濃度の元素を予め試料中に均一にドーブすることは実際は不可能である．このため，試料と同様の母体元素(マトリックス)をもち，かつ，それに含まれる微量元素の濃度が既知である標準試料を用いて試料と標準試料とを同一条件で測定する．そして，両者より得られたスペクトルの元素Xのピーク強度の大きさをそれぞれ比較する．標準試料中の元素Xの濃度を C'_x ，そして得られた元素Xのスペクトル強度を I'_x とすると，試料中の元素Xと標準試料中の元素Xとの

$$\frac{I_x}{I'_x} = \frac{n_p C_x M_x}{n_p C'_x M_x} \quad \dots 2-5)$$

$$C_x = \frac{C'_x I_x}{I'_x} \quad \dots 2-6)$$

スペクトル強度比は，2-5)で表されるので，2-6)から試料中の元素Xの濃度を求めることができる．つまり分析対象とする元素すべてについて標準試料と対比する必要は全くない．濃度較正係数M対原子番号相関は，データベー

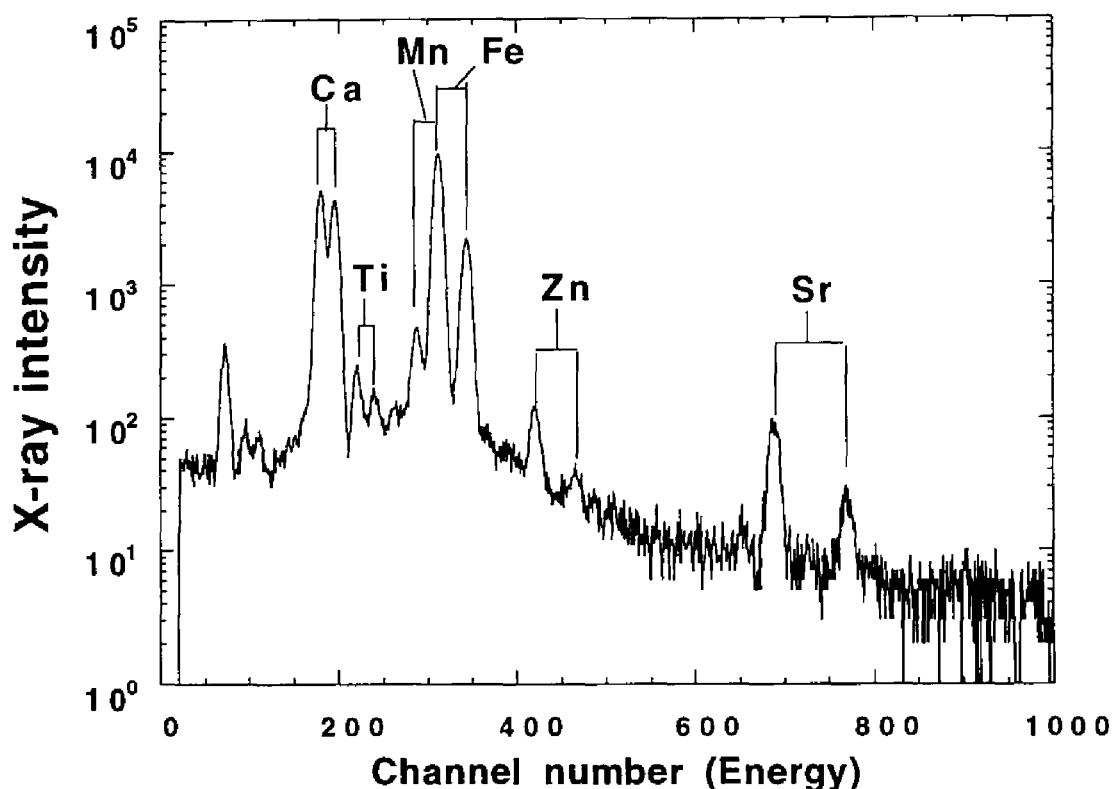


Fig.2-2. PIXE spectrum of the standard limestone SRM-1C certified by NIST. Beam charge: 22.5 μ C.

Table 2-1. Trace element concentration in the standard limestone, NIST-SRC-1C.

(Units: wt%)

Element	Ti	Mn	Fe	Sr
NIST certified value	0.04	0.019	0.38	0.025
Uncertainty	0.006	0.004	0.02	0.004
Found in this work	0.042	0.0176	0.380	0.0272
SD(n=3)	0.014	0.0008	0.001	0.0004

スにまとめられた S , σ , μ の既知の値を用い式 2-1 から計算した理論結果と良く一致する (Sasa et al., 1990; Suzuki et al., 1993; Maeda et al., 1993). 従って標準試料を用いて 2, 3 の元素の特性 X 線強度を測定して立体角, ビーム電流,

X線吸収体厚さの実効値を求めておき、理論計算を用いて内挿、外挿することによって全元素の濃度校正係数を得ることができる。このように、分析対象とする元素全てに対して、いちいち標準試料を作り、それと対比するというような煩雑な手続きが不要な点も、PIXE分析の重要な特徴の一つである。

得られたPIXEスペクトルから一連の計算処理を行うために、Clayton(1986)

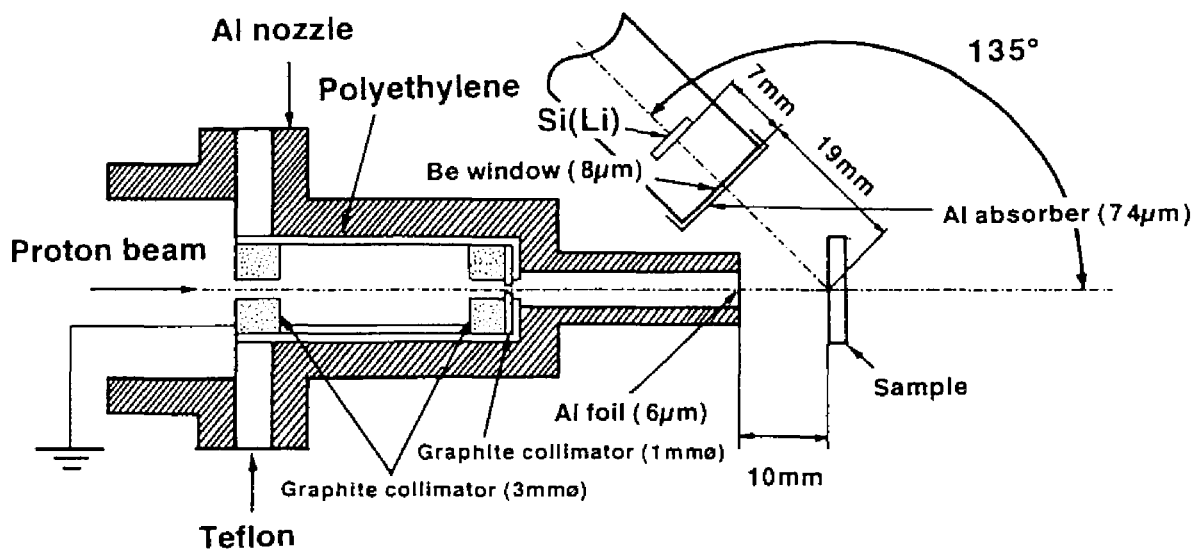


Fig.2-3. Experimental setup for in-air PIXE in RIKEN.

のコンピュータプログラムパッケージPIXANを用いた。PIXANは2つのプログラムから構成されている。ひとつはBATTYPCでPIXEスペクトルからバックグラウンドを差し引き、元素のピーク強度を求めるプログラムある。もうひとつは、THICKPCで2-2) 中の濃度校正係数を計算するプログラムである。

Fig.2-2 に理化学研究所のタンデトロン加速器を用いて1.6MeVプロトンを実験室に取り出して標準試料(Argillaceous limestone SRM-1C)を測定したスペクトルを示した。測定に当たっては、半導体検出器(Si(Li))の前に74μm厚のアルミニウム箔をX線アブソーバーとして用いた。このため、低エネルギー側のCaKαおよびCaKβが大きく減衰し、その代わり高エネルギー側のSr

Table 2-2. Preliminary PIXE analysis for otoliths from several teleost fish.

(Unit: ppm±SE)

Types	Species	N	Sr	Fe	Mn	Zn
Marine fish	Rockfish(Wild)	19	1719±44 ^{*1}	63±15	9±1.5	45±6.4
	Rockfish(Reared)	13	1547±36 ^{*1}	41±7.4	9±1.9	36±5.9
	Japanese flounder	1	2878	8	14	12
	Cod	1	3355	62	26	103
	Horse mackerel	1	4526	28	10	-
Anadromous fish	Sakuramasu A	8	1749±100 ^{*2}	**	17±1.1	36±6.1 ^{*3}
	Sakuramasu B	2	216±11 ^{*2}	**	25±12	202±53 ^{*3}
Freshwater fish	Lake Biwa catfish	1	737	58	14	251
	Ayu	2	1277	53	13	85
	Bluegill	10	498±20	**	14±0.7	17±1.7

*1 p<0.01 by Student's t-test.

*2 p<0.001 by Welch's t-test.

*3 p<0.001 by Student's t-test.

** No data.

のK α およびK β がはっきりと検出されている。このスペクトルからPIXANを用いて計算した各元素の測定値とNISTの保証値をTable 2-1に示した。Ti, Mn, Fe, Srの微量元素の濃度が再現良く測定できたことが分かる。なお、照射した電荷量は約40 μ Cであった。

2-4 PIXEによる魚類耳石の分析例

数種類の硬骨魚類の耳石の微量元素分析を試みた。分析を行った魚種は、クロソイ (*Sebastes schlegeli*), ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*), マアジ (*Trachurus japonicus*), サクラマス (*Oncorhynchus masou masou*) ビワコオオナマズ (*Silurus biwaensis*), ブルーギル (*Lepomis macrochirus*) およびアユ (*Plecoglossus altivelis*) である。耳石はすべて扁平石を取り出し、99.5%エ

タノール中で超音波洗浄を数回行い、汚れを取り除いた。

ブルーギルおよびサクラマス以外は理化学研究所タンデトロン加速器を用いた。使用したイオンビームはプロトンで、1.6MeVに加速し、2個の3mm径のグラファイトと1個の1mm径のグラファイトでビームを成形した後、6 μ m厚のアルミニウム箔を通して大気中に取り出した (Fig.2-3)。取り出したビームは大気中を10mm離れたサンプル表面で約1.2mm径に広がるとともに、エネルギーは1.6MeVから1.16MeVに減衰した。ビーム電流は取り出しのアルミニウム箔に接続した電流計でモニターした。X線の検出は、ビームに対して135度に設置した半導体検出器(Si(Li): EG&G社製、有効検出面積30mm²、分解能6keVで170eV)で行った。

測定するサンプルは、ほぼ純粋な炭酸カルシウムであるため、その主要元素であるカルシウムから放出される特性X線を減衰させるために、Si(Li)の前に74 μ m厚のアルミニウム箔をアブソーバーとして取り付けた。ビームの照準合わせは、2方向からレーザー光線を照射し、その2点が合わさったところに照射するサンプルが位置するように調整した。Si(Li)とサンプルの距離は19mmであった。測定はビーム電流をモニターしながら電荷量が10~40 μ Cで行った。Si(Li)で検出したX線を増幅した後、マルチチャンネルアナライザーによってスペクトルを1024チャンネルに分解しパーソナルコンピュータで取り込んだ。

ブルーギルとサクラマスについては、洗浄した耳石(扁平石)を高純度カーボンのバックング材に固定し、京都大学大学院工学研究科原子核工学専攻に設置されたイオンビーム分析装置で分析した。測定条件は、2MeVのプロトンを真空中で耳石表面に照射した。スペクトルの解析はPIXANで行ったが、鉄については、バックングに用いた高純度カーボンに少量の鉄の混入が認められたので定量分析は行わなかった。

測定結果をTable 2-2に示した。微量元素として、ストロンチウムをはじめEPMAでは定量が困難な濃度である鉄、マンガン、亜鉛を定量することがで

きた。

クロソイ(*Sebastes schlegeli*)から検出されたストロンチウムは天然魚の方が人工生産された種苗よりも有意 ($p < 0.001$) に多く含まれていた。種苗生産時には加温していたことから水温の違いがストロンチウムの濃度に影響していた可能性がある (Arai et al., 1995)。

海産魚と淡水魚を比較すると、海産魚ではストロンチウム濃度が高いのに対して、淡水魚は相対的に亜鉛の濃度が高いことが分かる (Arai et al., 1994)。さらに、遼河回遊を行うサクラマスの場合、明らかにストロンチウムと亜鉛の濃度が海産魚と同程度のグループ (A) と淡水魚と同程度のグループ (B) が存在している (Table 2-2)。これらのサンプルは全て神通川で捕獲されたものであるが、ストロンチウム濃度が高く亜鉛濃度が低いグループ (A) は遼河直後の個体である可能性が示唆される (Nagata et al., in press)。

このように、PIXEを用いることでEPMAでは測定限界以下の魚類耳石中の微量元素を非破壊でかつ比較的短時間 (1 サンプル数分) に多元素を同時に測定できることが分かった。

2-5 第2章のまとめ

1) 魚類の耳石中に含まれる微量元素の分析手法として, PIXE(Particle Induced X-ray Emission: 荷電粒子励起 X 線分析手法) を導入した.

2) PIXE の原理は, 数 MeV に加速したイオンビームをサンプルに照射して出てくる特性 X 線を半導体検出器等で測定する手法である. X 線の励起に電子線を用いる EPMA(Electron Probe Micro Analysis) と比べて原理的に 2 次電子の制動放射(Bremsstrahlung production)によるバックグラウンドが小さいために EPMA よりに高感度である.

3) 魚類耳石はほぼ純粋な炭酸カルシウムとみなせるので, PIXE 分析に当たっての標準試料として NIST argillaceous limestone SRC-1C を用いることで, 再現性のよい定量分析が行えた. また, 主成分のカルシウムから放射される $K\alpha$, $K\beta$ によって検出器が飽和状態となるのを防ぐために, アルミニウムをアブソーバーとして用いることが適当である.

4) PIXE スペクトルの解析には, PIXAN(Claton, 1986) を用いることで, パーソナルコンピュータによる処理が行えた.

第3章 マダイ耳石の微量元素分析と水温

3-1 PIXE によるマダイ耳石中の微量元素分析

3-1-1 研究の背景と目的

Smith et al. (1979) によって、造礁サンゴの骨格である炭酸カルシウム（アラゴナイト）の結晶中のストロンチウム-カルシウム比（以下，Sr/Ca）が海水温のよい指標になることを明らかにされて以来，同じくアラゴナイトの結晶である魚類の耳石中に含まれるSr/Caを用いて水温を推定する試みが多く、魚類で行われてきた（Radtke et al., 1990；Townsend et al., 1992；Kalish, 1992；Secor, 1992）。しかしながら，海洋生物の硬組織中に含まれる微量元素濃度と水温等の環境条件には，単純な関係があるわけではない。増田（1986）は，様々な海洋生物の炭酸カルシウムを主成分とする硬組織中の微量元素と水温や塩分等との様々な関係を示す既往の文献を整理し，かつ，その関係についての合理的な説明として最適条件モデルを提唱している（Masuda, 1985）。極端な場合，同じ貝殻でもその部位によって炭酸カルシウムの結晶構造が異なっており，カルサイトの部分とアラゴナイトの部分とでストロンチウムの濃度と水温との関係が逆転している場合もある（Dodd, 1965）。また，耳石中にはストロンチウム以外にも様々な元素が含まれており，その変動が環境条件とどのように対応しているかは興味深い問題である。Sje and Thresher (1992) は魚類耳石をPIXEで分析することで，他のX線分析手法に比べて桁違いに微量な元素が定量できることを示した。

本章では，PIXEを用いて魚類耳石の微量元素分析を行った。魚類耳石は，平衡感覚や聴覚を司る内耳の耳石嚢にsagitta（扁平石），lapillus（礫石），asteriscus（星状石）の3種類が一對となって入っている（Carlström, 1963）。マダイの場合，扁平石が他の二つの耳石に比べて大きい。本研究ではマダイの扁平石の表面をPIXEで分析した。

3-1-2 材料および方法

供試魚は第1章で用いたマダイ稚魚と同じサンプルであり、(社)日本栽培漁業協会と京都府立海洋センターの協力の下、異なる次の3海域、愛媛県伯方島 (HT)、広島県百島 (MS)、京都府宮津 (MZ) で飼育された。HTおよびMSは伯方島事業場で同じ親魚グループから得られた種苗である。なお、比較のために京都府伊根沖および兵庫県垂水沖で漁獲された天然の成魚を用いた。

1993年6月から8月にかけて中間育成中の稚魚を約10日間隔でサンプリングし、脱灰 (Tucker and Chester, 1984) を防ぐために70%エタノールで保存

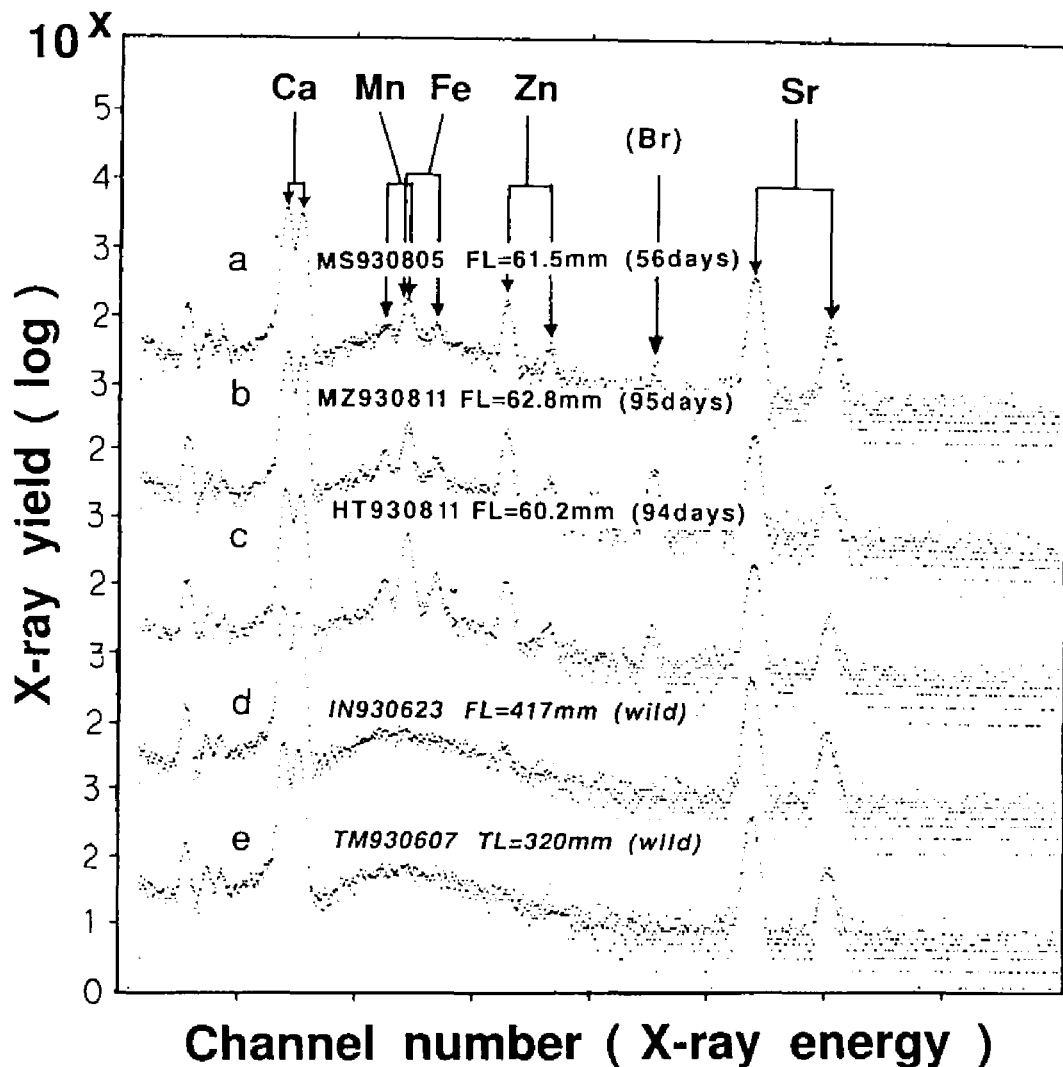


Fig.3-1-1. Typical otolith PIXE spectra obtained with a 1.16MeV proton beam in air. a, b, and c: reared red sea bream in Momoshima, Miyazu, and Hakatajima, and d: wild fish sample caught off Ine in the Sea of Japan and e: caught off Kobe in the Seto Inland Sea.

Table 3-1-1. Sampling date, number of specimens, days after hatch, fork length (FL) and concentration of trace elements in otoliths from red sea bream in three experimental stations; Momoshima (MS), Hakatajima (HT), and Miyazu (MZ) in 1993.

MS				(Units: mm±SE and ppm±SE)			
Date	N	Days after hatch	FL	Sr	Fe	Mn	Zn
29 June	5	19	13.8±1.5	2542±87	317±86	19±13	132±25
12 July	6	32	29.3±1.0	2285±51	93±14	42±7.6	26±4.1
19 July	6	39	35.6±1.0	2494±31	352±24	178±22	223±16
28 July	6	48	47.9±1.7	2282±95	423±81	69±8.4	178±22
5 Aug.	6	56	60.5±1.3	2091±61	69±7.8	25±2.8	82±9.4
Mean	29			2332±41	248±35	68±12	128±15
HT							
1 July	4	53	25.4±1.0	1728±46	69±12	27±1.5	32±7.2
11 July	5	63	32.1±0.5	1758±49	68±5.0	28±3.8	21±3.1
14 July	6	66	37.8±0.8	1662±41	116±12	31±1.4	44±12
11 Aug.	6	94	64.5±1.5	1967±66	465±24	107±9.9	138±12
23 Aug.	6	106	71.4±1.7	1640±39	187±29	46±5.4	74±12
Mean	27			1752±32	194±31	50±6.6	65±9.5
MZ							
8 July	6	61	29.0±1.2	1501±97	284±35	90±5.9	199±20
15 July	6	68	35.0±0.8	1590±61	157±21	60±5.0	116±11
19 July	6	72	37.2±1.6	1660±58	173±21	52±5.1	137±13
27 July	6	80	48.1±1.4	1531±46	86±11	18±2.2	43±11
2 Aug.	6	86	60.4±1.6	1814±66	163±42	15±3.5	55±8.6
Mean	36			1635±32	170±14	43±4.9	103±10

した。稚魚の尾叉長を測定した後、耳石のうち、扁平石を取り出して99.5%エタノール中で超音波洗浄を数回行い汚れを取り除いた。洗浄を終えた耳石はPIXE分析のために別途作製したサンプルホルダー(15mm四方のアルミニウム枠にカプトン100Hを瞬間接着剤で接着)に接着剤(セメダインC)で縦溝側(sulcus)を上にして固定した。

測定は理化学研究所タンデトロン加速器で行った。測定条件等は第2章で述

べたとおり，1.6MeV プロトンを大気中に取り出して行った。

実験期間中の水温は水深 1.5m に設置した MDS-T を用いて測定した。

3-1-3 結果

Fig.3-1-1 に得られた典型的な PIXE スペクトルを示す。低エネルギー側の X 線はアブソーバ (74 μ m のアルミニウム箔) によって減衰されている。このため，高エネルギー側のストロンチウムのピークまで明瞭に検出できている。3 海域のマダイ稚魚の耳石には，主成分であるカルシウム以外にマンガン，鉄，亜鉛およびストロンチウムが含まれていることが分かる。天然成魚にはカルシウム以外の微量元素としてはストロンチウムと亜鉛以外はほとんど含まれていない。なお，臭素のピークが稚魚の耳石で検出されたが，これは，サンプルホルダーとして，当初カプトンの代わりに使用したニュークリポアフィルターに含まれていたものである。このように，PIXE は極めて感度が高いので，サンプルの取扱い，特に固定方法には細心の注意を払う必要がある。

得られた PIXE スペクトルから第 2 章で述べた解析手法を用いて微量元素の濃度を求めた。この際，耳石はほぼ純粋な炭酸カルシウムのマトリクスと仮

Table 3-1-2. Sample name, sampling date, fork length (FL), and concentration of trace elements in otoliths of wild red sea bream; Tarumi (TM1, 2) off Kobe in the Seto Inland Sea and Ine (IN 1-3) off Kyoto in the Sea of Japan in 1993.

(Units: mm and ppm)						
Sample name	Sampling date	FL	Sr	Fe	Mn	Zn
TM1	7 June	320* ¹	1661	15	16	0
TM2	20 November	233	1984	0	10	19
IN1	23 June	386	2706	13	10	11
IN2	23 June	417	1688	7	14	13
IN3	23 June	307	1816	10	14	23
Mean \pm SE		336 \pm 42* ²	1971 \pm 192	9 \pm 2.6	13 \pm 1.2	13 \pm 3.9

*¹: Total length.

*²: Without TM1.

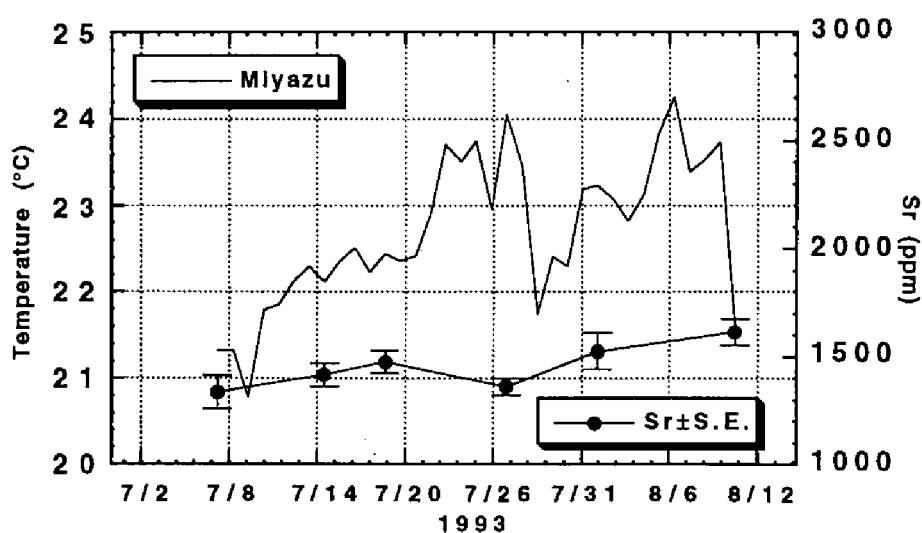
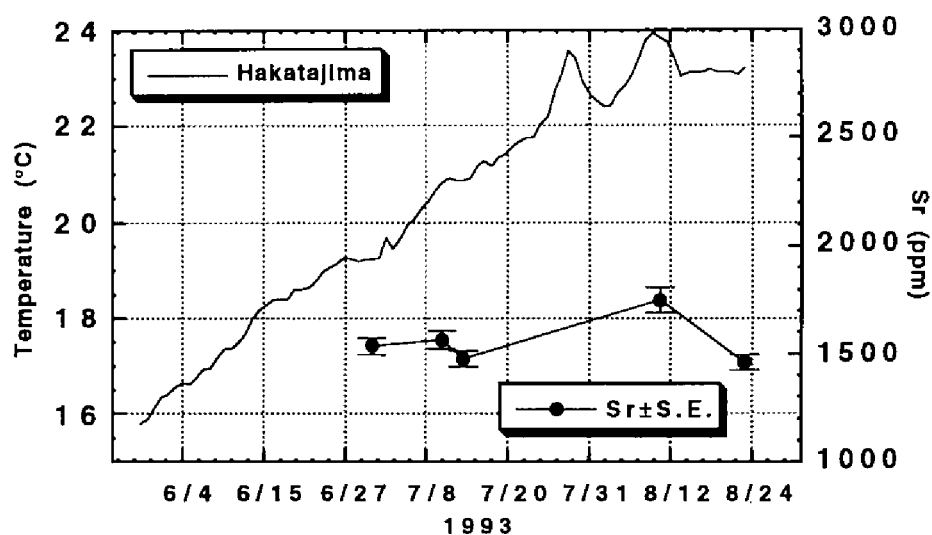
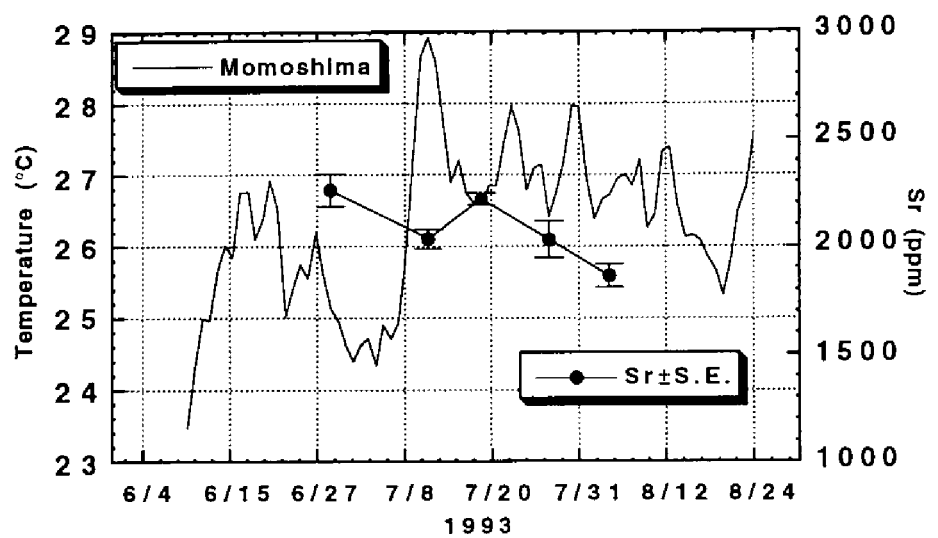


Fig.3-1-2. Fluctuations of seawater temperature and of strontium concentration in the three stations.

定して計算を行った (Ichii and Mugiya, 1963). Table 3-1-1 および Table 3-1-2 に3海域から得られたマダイ稚魚耳石と天然成魚耳石の微量元素濃度を示した. さらに, 3海域の水温変動とストロンチウム濃度を Fig.3-1-2 に示した.

3-1-4 考察

Table 3-1-1 から3海域のマダイ稚魚耳石の微量元素はストロンチウムをはじめ, 鉄, マンガンおよび亜鉛が定量できた. 比較的多量に含まれているストロンチウムについても, 主元素のカルシウム(ほぼ純粋な炭酸カルシウムとしてカルシウムは約40%)との濃度比は0.0041(宮津)~0.0058(百島)と低い値である. これは, 海水中のカルシウムの存在量(400mg/l)とストロンチウムの存在量(8mg/l)から得られる濃度比0.02 (Broecker, 1981, 野崎, 1992)に比べて数分の一の小さな値である. このことから, 耳石が形成される過程でカルシウムとストロンチウムの海水からの取り込みが選択的であることが示唆される. さらに, 他の元素についてはストロンチウムに比べて更に1~2桁濃度が低い. これらのことから, 耳石は極めて純度の高い炭酸カルシウムの結晶であり, マダイ稚魚が海水中からミネラルを取り込む過程において, 高度な元素の選択性が働いていると考えられる.

Fig.3-1-1で示したPIXEスペクトルから中間育成中の稚魚(a, b, c)と日本海および瀬戸内海で漁獲された天然の成魚(d, e)とで, マンガン, 鉄, 亜鉛のピークに違いがあることが分かる. これらの微量元素の濃度を比較すると, ストロンチウムについては天然魚は稚魚の範囲内に収まっているものの, ストロンチウム以外の元素については, 鉄, マンガン, 亜鉛ともに稚魚が天然魚の数倍から数10倍の濃度を示している (Table 3-1-1, Table 3-1-2). この違いが何に起因しているかについての詳細は本実験からは明らかにできないが, 鉄, マンガン, 亜鉛は, ストロンチウムとは異なり生体にとっては必須元素である. 特に鉄は稚魚であれ成魚であれ血液中のヘモグロビンに多量に含まれている. また, これらの必須元素は個体の成長期にはより多量に必要であろう. よって, 成魚よりも稚魚の耳石中により多量の鉄, マンガン, 亜鉛が含

まれているのは、急激な成長期である稚魚に特有の現象であることが考えられる。

日平均水温の変動とストロンチウム濃度の対応を Fig.3-1-2 に示した。しかし、ストロンチウム濃度と水温変動とには、明確な対応関係は得られなかった。この理由として、日変動のような水温の短期間での変化に対してストロンチウムの取り込みの変動が追随していない可能性や、PIXE分析では耳石表面に照射したプロトンビームが表面から数ミクロンまで進入するため、得られた値は、サンプリングを行った時点から逆に数日間の平均的な値を示していることが挙げられる。

こうした現象を考慮すると、耳石表面にイオンビームを照射して得られた微量元素濃度は、その海域の平均的な値として取り扱うことが適当と考えられる。そこで実験期間中の平均水温と海域ごとの全サンプルの微量元素濃度の平均値を検討する。百島、伯方島および宮津の実験期間中の平均水温はそれぞれ 26.6℃、22.0℃および 22.7℃でこれに対応するストロンチウム濃度は $2332 \pm 41 \text{ ppm}$ 、 $1752 \pm 32 \text{ ppm}$ および $1635 \pm 32 \text{ ppm}$ となり、水温の高い百島で高い濃度を示している。この結果は、既往の知見で得られている他の魚種とは異なっている。すなわち、*Fundulus heteroclitus* (Radtke, 1989)、*Clupea harengus* (Townsent et al., 1992) では水温とストロンチウム濃度には逆相関がある。一方、全く無機的な反応においては、ストロンチウムとストロンチウムの混合溶液中から析出する炭酸カルシウムの結晶中のストロンチウム濃度は、水温と逆相関があることが知られている (Kinsman and Holland, 1969)。よって、水温とストロンチウム濃度の逆相関性については、定性的には耳石が体液から析出する際の無機的な作用に及ぼす温度の熱化学的な影響と考えることができる。しかし、水温とストロンチウム濃度との正の相関性は、無機的な現象を量的に上回る生物的な作用機作の存在が示唆されるところである。また、金魚では水温が 15℃ から 24℃ では正の相関があるが、24℃ から 26℃ では関係が逆転する (Mugiya and Tanaka, 1995) ことから、水温と魚類耳石中のストロンチウム濃度との関係は、魚種ごとに詳細に検討する必要がある。

る。

マダイ稚魚の場合、水温と耳石中のストロンチウム濃度との関係を求めるには、マダイが産卵・ふ化する春から夏にかけての生息水温と考えられる10数℃から20数℃の水温範囲を念頭に置いて、実験を行う必要がある。次章において、その実験結果を示す。

宣統元年(1909年)冬, 奉天巡撫奏准, 在宣化府城內, 以城隍廟舊址各水塘, 建 45 口之鰲池, 1904 年春, 竣工。在鰲池內, 有木柱 50 餘根, 柱上築以石梁, 梁上 築以石板, 板間以木角釘各處相連, 池水可以收貯。1904 年夏, 戶部臣奏准, 在鰲池內, 築以石梁, 梁上築以石板, 板間以木角釘各處相連, 池水可以收貯。

照は、この「カ」の字のひらがな配字判和種部5号を毎冊1枚添付し、以後、以後の増刷の増刷が随時なされた。

圖例如下，Exp1 為 1 級客運車，Exp2 為 1 級客運車，Exp3 為 1 級客運車，Exp4 為 1 級客運車。

3-2 飼育実験による水温とマダイ稚魚耳石中のストロンチウム - カルシウム比

3-2-1 研究の背景と目的

前節の実験から、マダイ稚魚耳石に含まれるストロンチウム濃度が平均水温の高い飼育環境で高くなることが示唆された。本節では水温を一定に制御した水槽実験でストロンチウム - カルシウム比 (Sr/Ca 比) と水温との関係を求めた結果について述べる (Arai et al., 1996)。

3-2-2 材料および方法

飼育実験は京都大学農学部附属水産実験所で行った。実験水槽は、100 l ポリカーボネイト水槽を用いて自然水温区 (No.1), 26℃区 (No.2), 23℃区 (No.3), 20℃区 (No.4), 17℃区 (No.5) の5区を設けた。26℃区および23℃区は500 Wの冷却器をそれぞれ1台、20℃および17℃は同冷却器をそれぞれ2台用いて水温を調節した。飼育水は濾過海水を分水器でそれぞれの水槽に導き、一日当たり6回転の割合で注排水した。各水槽はそれぞれエアーストーンによる適度な通気を行った。各水槽の中央部分に設置したサーミスターの抵抗値を1時間間隔で24チャンネルのデジタルロガー (A&D 社) に記録し、後で抵抗値を水温に換算した。

実験は2回行った。第1の実験 (Exp.1) はふ化後64日目の稚魚を各水槽に45匹ずつ収容し1994年7月21日から8月5日まで飼育した。第2の実験はふ化後119日目の稚魚を各水槽に15尾ずつ収容し1994年8月11日から19日まで飼育した。

餌は (株) ヒガシマルのひらめ配合飼料種苗5号を毎日午前8時、正午、午後5時の3回稚魚が飽食するまで与えた。

飼育終了後、Exp.1からは各区6尾、Exp.2からは各区15尾をPIXE分析に

Table 3-2-1. Observed temperature, number of specimens, and fork length of juvenile red sea bream. The first experiment was carried out from 21 July to 5 August 1994 (Exp.1), and the second experiment from 11 to 19 August 1994 (Exp.2).

Exp.1				(Units: °C±SD and mm±SD)
Tank No.	Temperature	Number of specimens	Fork length	
1	16.8±0.3	5	41.1±6.6	
2	19.7±0.4	6	42.1±7.3	
3	22.9±0.3	6	51.7±9.1	
4	25.9±0.3	6	50.5±7.2	
5	27.7±0.6	6	50.5±7.2	

Exp.2				(Units: °C±SD and mm±SD)
Tank No.	Temperature	Number of specimens	Fork length	
1	16.6±0.3	15	97.1±5.3	
2	19.2±0.4	15	95.8±6.4	
3	23.0±0.2	15	99.1±7.4	
4	25.8±0.2	13	99.9±6.4	
5	28.9±0.5	13	99.3±5.8	

供した。耳石の洗浄，分析方法は前節と同様に行った。

3-2-3 結果

Table 3-2-1 に PIXE 分析に供したサンプルの飼育水温と尾叉長の平均値を示した。平均水温はほぼ正確に設定水温を示していた。尾叉長は Exp.1 で 31mm から 66mm，Exp.2 で 82mm から 108mm の範囲であった。北島 (1978) によると Exp.1 は稚魚期，Exp.2 は未成魚期に該当する。

PIXE は理化学研究所のタンデトロン加速器を用い，大気下で測定した。測定条件，解析手順は第 2 章および前節で述べたとおりである。

耳石をほぼ純粋な炭酸カルシウムとして Sr/Ca 比を求め，飼育水温との関係を Fig.3-2-1 に示した。稚魚期 (Exp.1) の結果と未成魚期 (Exp.2) との結果を比較すると，稚魚期の場合，各水温区間で明らかに Sr/Ca 比に有意な差が見られたが，未成魚期の場合には有意な差は見られなかった ($p < 0.01$ および

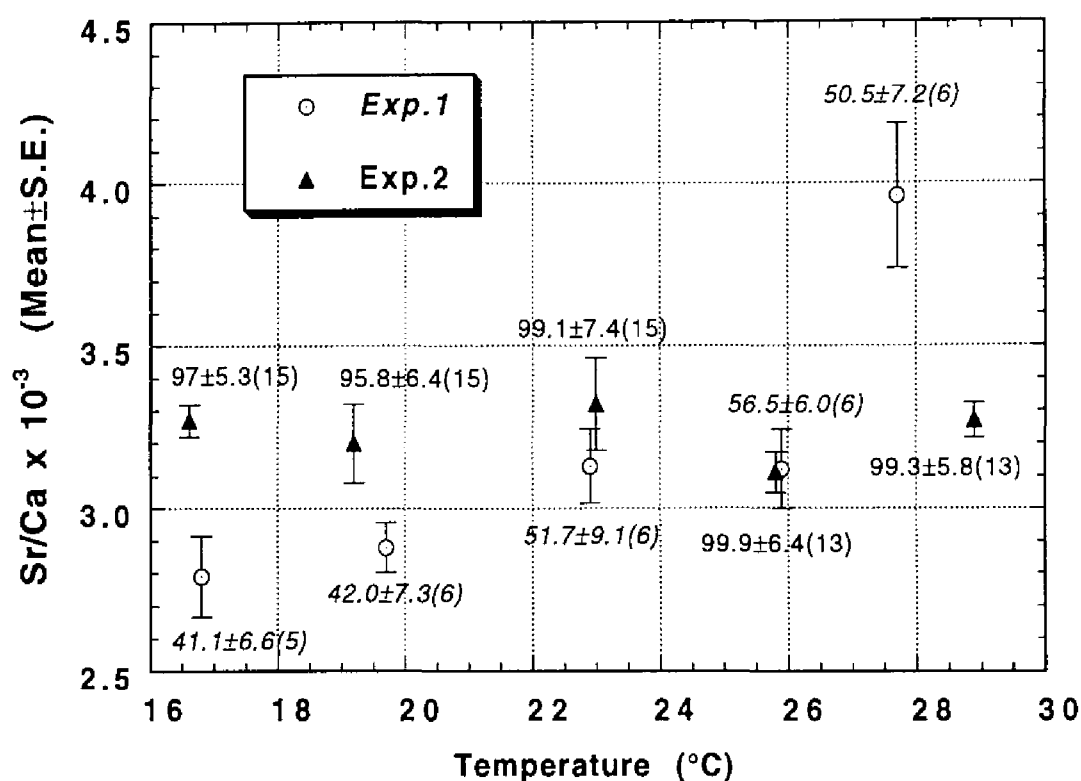


Fig.3-2-1. Correlation between seawater temperature and Sr/Ca ratios in juvenile red sea bream otoliths. Error bars indicate the standard errors. Numerals in the figure show the FL±SD and number of specimens.

p=0.28, Kruskal-Wallis テスト).

3-2-4 考察

カルシウムとストロンチウムは化学的性質が極めて類似しているが、動物にとってカルシウムは必須元素であるがストロンチウムは非必須元素である。このため、動物はカルシウムとストロンチウムを識別して取り込んでいる (Commar et al., 1964)。また、その識別する機能は年齢に影響され、ラットの場合、腸管におけるカルシウムとストロンチウムとの識別能力が若齢ラットの方が成熟ラットより低いことが報告されている (Kobayashi et al., 1991)。

魚類の場合、多くのミネラルは鰓を通して吸収されることから、ラットによる腸管のカルシウム-ストロンチウムの識別能力の結果を当てはめることには問題がある。しかし、尾叉長の範囲が31mm から 66mm の稚魚期のマダイは、水温が高くなるほど Sr/Ca 比が大きくなるのに対して、尾叉長の範囲が 82mm から 108mm の未成魚期のマダイの場合は、水温が 16.6℃ から 28.9℃ の範囲で Sr/Ca 比は一定値を示したことは、カルシウム-ストロンチウムの識別能力がマダイの場合においても成長段階で異なっている可能性を示唆している。

これらの結果から、マダイ耳石中の微量元素から水温履歴を解析する際には、マダイの大きさに注意を払う必要があることが分かった。本実験では少なくとも尾叉長31mm～66mmの稚魚期ではストロンチウム濃度が水温とともに高くなることが示されたが、それ以外の尾叉長でこの関係が維持されるかは不明である。

3-3 マダイ稚魚の耳石中に含まれる微量元素と水温

3-3-1 研究の背景と目的

マダイ稚魚耳石中に含まれる微量元素をPIXEで測定することが可能となった。また、飼育実験の結果、稚魚の場合は水温が高いほどストロンチウムの濃度が高くなるものの、未成魚では温度に関わらず一定の濃度を示した。このことからマダイの成長段階によっては必ずしも水温とストロンチウムの濃度が相関を示さない場合もあることが示唆される。また、水温とストロンチウムの濃度との関係は、他の魚種で示されている関係とはマダイの稚魚の場合、逆の関係であることから、魚種による違いがあることが分かった。

本節では、様々な海域で中間育成されているマダイ稚魚と沿岸海域で漁獲される天然マダイ稚魚の耳石中の微量元素と飼育水温および沿岸域の水温と対応させて検討を行う。

3-3-2 材料および方法

社団法人日本栽培漁業協会、京都府、和歌山県および大分県漁業公社の協力を得て、中間育成中のマダイを供試魚とした。天然マダイについては、新潟県、京都府、島根県および長崎県の協力を得て、それぞれの地先で漁獲された稚魚を供試魚とした (Table 3-3-1)。

水温は水深 1.5 m に設置した MDS-T で 1 時間間隔で測定した。供試魚を得た日から遡って 10 日間の平均水温を計算し、その供試魚の経験水温とした。

耳石の処理に関しては既に述べたとおり、99.5%エタノールで超音波洗浄を行い PIXE 分析に供した。

PIXE分析は京都大学工学部原子核工学教室放射実験室に設置されたイオンビーム分析装置を用いた。耳石は乾燥の後、原子炉用として特殊処理をしたカーボンプレートにセメダインで固定した。測定は 2MeV のプロトンビームをスリットで 1.5mm x 1.5mm に成形し、真空中でサンプルに照射して行った。

Table 3-3-1. Sample stations, number, fork length (FL) and mean temperatures for PIXE analysis.
(Units: mm, °C)

Station	D/M/Y	Number	FL±SD	Mean temp.
Kushimoto	4/7/1994	5	61.3±2.4	23.1
Kata	23/8/1994	5	64.8±7.3	27.5
Ohita	18/7/1994	5	40.2±3.8	23.6
Momoshima	8/8/1994	5	47.1±6.7	31.4
Hakatajima	31/7/1994	5	64.1±3.8	25.3
Miyazu	8/8/1994	5	72.0±3.6	28.8
Hamazume*	4/8/1994	5	63.5±2.8	22.4
Kushimoto	20/7/1995	5	60.3±2.6	21.4
Hamadume*	1/8/1995	5	62.5±3.5	25.5
Nagasaki*	6/8/1995	5	51.1±2.5	26.4
Shimane*	31/7/1995	5	66.7±3.8	27.0

*Wild fish.

サンプルからの特性X線はSi (Li) で検出した。定量分析を行うために、NIST limestone をペレット成形した標準試料を実験中に5～6回照射した。

得られたPIXEスペクトルの解析は、第2章で述べたとおりPIXAN (Clayton, 1986) で行った。

3-3-3 結果

1994年および1995年に各海域から得たマダイ稚魚サンプルはTable3-3-1のとおりである。1994年は浜詰以外は放流用として中間育成された稚魚である。1995年は串本以外は浜詰および島根は定置網、長崎は曳網で漁獲された天然魚である。得られたサンプルからそれぞれ5個体を無作為にPIXE分析に供した。

マダイ稚魚耳石中からマンガン、亜鉛、ストロンチウムを定量した。PIXEスペクトルには鉄のピークも認められたが、サンプルホルダーとして使用したカーボンプレートに少量の鉄が混入していることが分かったので、定量分析は行わなかった。

マンガン、亜鉛およびストロンチウムの濃度を平均水温に対してプロット

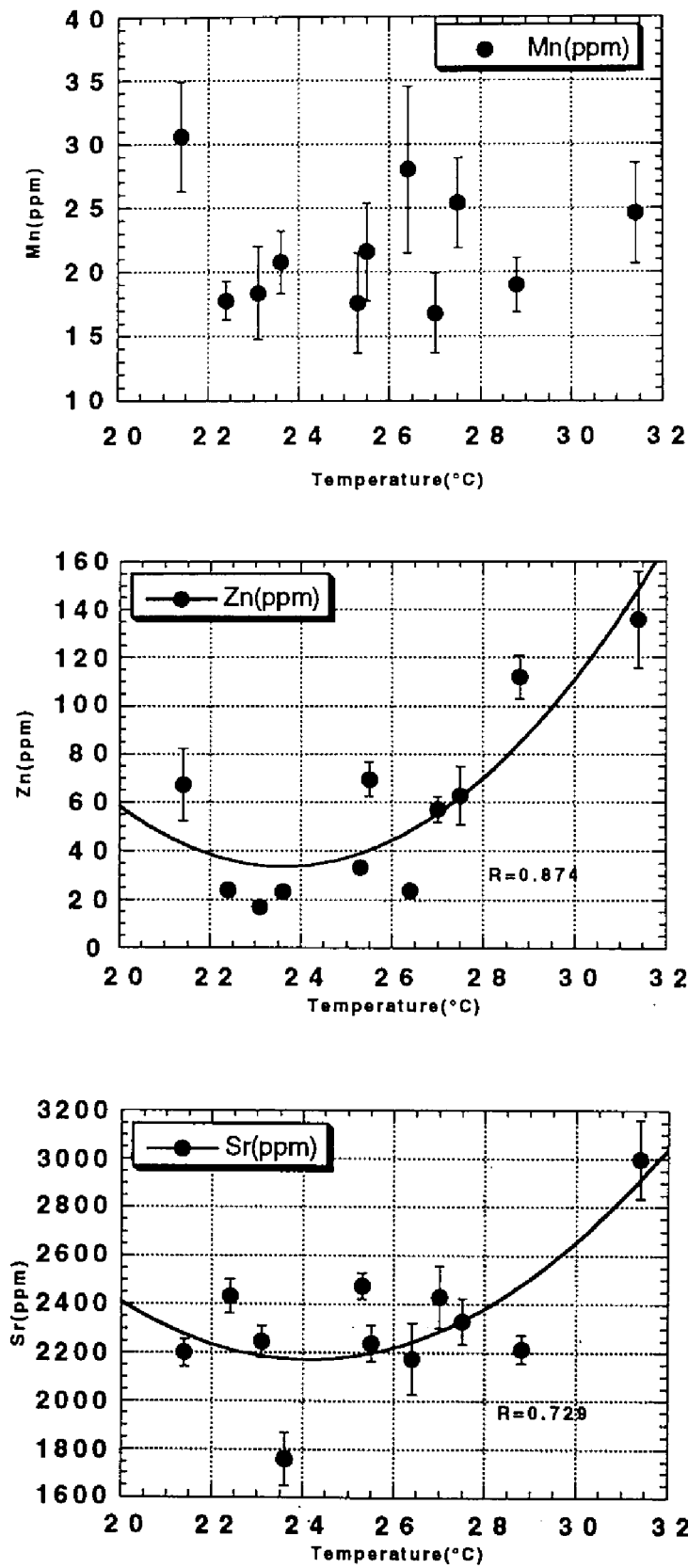


Fig.3-3-1 Relationship between temperature and trace metal concentration. Solid circle with vertical bar (\pm SE) represents each group listed in Table 3-3-1.

した (Fig.3-3-1). マンガンの濃度と水温には一定の関係は認められなかったが、亜鉛およびストロンチウムの濃度と水温には2次曲線で回帰したところ、有意な関係が認められた。それぞれの相関係数は、亜鉛が $R=0.874$ 、ストロンチウムが $R=0.729$ であった。

3-3-4 考察

Masuda (1985) は二枚貝の貝殻中の微量元素の濃度変動と水温との関係を最適条件モデルで説明した。貝殻の主成分である炭酸カルシウムへの微量元素の取り込みと元素のイオン半径とには、カルシウムを頂点とした上に凸な放物線で表せることができる。そして、この放物線の形状が貝の生理状態によって変化する。すなわち、放物線の形状が尖るとカルシウム以外の元素の取り込みが減少し、逆に放物線が広がるとストロンチウムをはじめとした二価の金属の取り込みが増える。この仮説を魚類の耳石に適用すれば、魚種によって最適水温が異なるので、耳石中の微量元素と水温との関係が正相関であったり、逆相関であったりすることの説明が可能である。

マダイ稚魚の場合、北島 (1978) は、飼育水温が $17.1^{\circ}\text{C} \sim 24.7^{\circ}\text{C}$ であれば、水温が高いほど成長は良いが、積算水温と全長との関係は、この水温の範囲であれば飼育水温にかかわらず、同じ直線関係で表せることを示した。すなわち、マダイ稚魚にとってはこの水温範囲がおおよそその最適水温であると考えられる。そして、これから著しく逸脱するような高水温下では、第1章1-2でも述べたとおり、成長が頭打ちになると同時に、耳石中に取り込まれるカルシウムと同価の微量元素の濃度が高くなる。逆に最適水温の範囲においては、カルシウムと他の元素との識別が正常に働くことから水温の変化に対する微量元素の濃度変化が明瞭でなくなることが考えられる (Fig.3-3-1, Sr)。

いずれにせよ、実際の海域における水温変化に対して、ストロンチウムと亜鉛の濃度とには一定の関係が見られた。しかし、耳石中に含まれるストロンチウム以外の微量元素は、亜鉛で数10ppmから数100ppm、マンガンでは数

10ppm 前後と極めて低い濃度である。Gunn et al. (1992), Sie and Thresher (1992) が指摘しているとおり、この程度の低い濃度の場合、耳石の微量元素分析において一般的に使われてきた電子線を X 線の励起源とした EPMA での定量分析は困難である。一方、微量元素の濃度と水温との対応関係から個体の水温履歴を復元するためには、耳石の断面に形成された成長線をタイムマーカーとした微小領域の元素分析を行う必要がある。このためにはビームの径をミクロンオーダーに絞り込んだマイクロPIXEを導入すればよい。しかし、残念ながら現在我々が使用しているPIXE分析装置ではマイクロビームを使用することは不可能である。このため、マイクロPIXEは今後の課題として、少なくともEPMAで測定が可能な濃度レベルであるストロンチウムに関して耳石断面の分析を行うこととした。

3-4 第3章のまとめ

1) マダイ稚魚の耳石に含まれる微量元素をPIXEで分析した。この結果、耳石には主成分のカルシウムの他にストロンチウム、亜鉛、鉄、マンガンが含まれていることが明らかになった。

2) このうち、ストロンチウムは比較的多量に含まれていたが、海水中のストロンチウムとカルシウムの濃度比 (0.02) に比べると数分の一の小さな値であった。また、その他の元素ではさらに数10~100分の一の低い濃度を示しており、マダイ稚魚の耳石が極めて純度の高い炭酸カルシウムの結晶であることが明らかとなった。

3) ストロンチウムの濃度と水温との関係を求めるために、水温を制御した実験を行った。この結果、ストロンチウムの濃度は既往知見であるマダイ以外の魚種や造礁サンゴのアラゴナイトとは逆に水温の上昇とともに増加することが分かった。また、この関係は稚魚期で見られるものの、若魚期では見られないことが分かった。

4) これらの結果を踏まえて1994年と1995年に延べ11海域から得た尾叉長90mm未満の稚魚の耳石の微量元素を分析したところ、ストロンチウムに加えて亜鉛においても水温が上昇すると濃度が増えることが明らかとなった。

第4章 水温履歴の解析と個体群解析への応用

4-1 マダイ稚魚耳石断面からの水温履歴解析

4-1-1 研究の背景と目的

第3章の結果、マダイ稚魚の耳石中に含まれる微量元素の内、ストロンチウムと亜鉛の濃度の変動は水温変動に関係していることが明らかとなった。よって、水温履歴の解析のためには蓄積形成された耳石の断面に沿った微量元素分析を行えばよい。マダイ以外の魚種では、大西洋ニシン (*Clupea harengus*) の天然稚魚の経験水温を耳石断面から推定した例 (Townsend et al., 1989; Radtke et al., 1990) やストライプトバスの耳石断面から海水と汽水域との回遊生態解明への応用 (Secor, 1992) や、サケ科魚類の遡河行動の推定 (Kalish, 1990) およびシラスウナギの耳石からレプトケファラスへの変態時期の推定 (Otake, 1994) や沿岸域への来遊時期を塩分とストロンチウム濃度から推定する試み (Tzeng et al., 1994; Tzeng and Tsai, 1994; Tzeng 1994; Tzeng, 1996) 等が行われている。これらの研究では走査型電子顕微鏡 (SEM) にX線検出器を装着したEPMA (Electron Probe Micro Analyzer) で耳石断面の微小領域を分析することで履歴情報の解析を行っている。Gunn et al. (1992) は走査型電子顕微鏡による微量元素分析手法の手順とその適用の限界について詳細に検討している。これによるとエネルギー分散型EPMA (ED-EPMA) では5000ppm以下の元素の定量は困難であり、ストロンチウムを含む魚類耳石中に含まれる微量元素の定量分析には、波長分散型EPMA (WD-EPMA) を使用すべきであると述べている。

本研究の第4章以外ではWD-EPMAよりも原理的に感度の高いPIXEを使用して定量分析を行った。そして、PIXEにおいても分析プローブであるイオンビームをミクロンオーダーに絞り込むことでEPMAと同様の微小領域の分析がWD-EPMAを上回る感度で行える (Sie and Thresher, 1992)。しかし、この

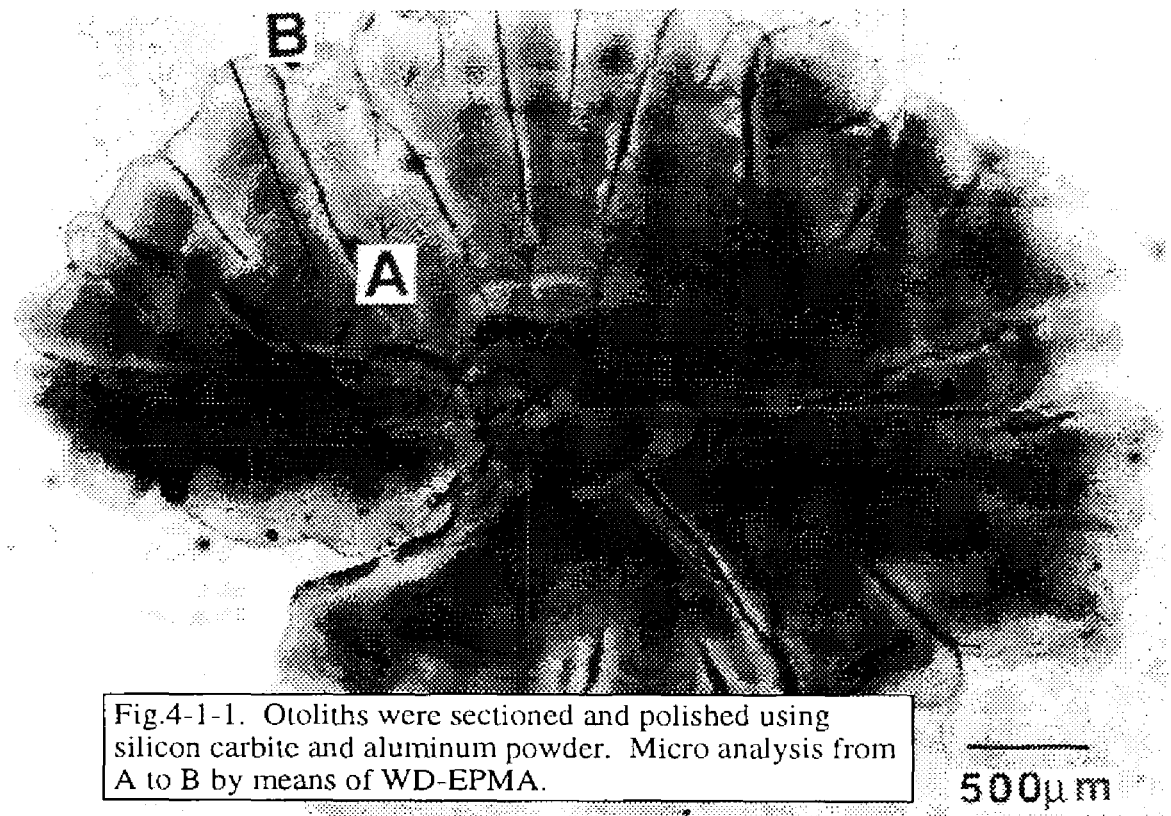


Fig.4-1-1. Otoliths were sectioned and polished using silicon carbide and aluminum powder. Micro analysis from A to B by means of WD-EPMA.

マイクロPIXEは未だ開発段階の技術であり、我々が使用しているPIXEシステムには装着されていない。

このため、本章の目的である個体の履歴情報解析を行うに当たり、WD-EPMAを使うこととした。PIXE分析の結果、マダイ稚魚の耳石には、数1000ppmのストロンチウムが含まれていることが分かっているので、WD-EPMAによる測定を行うことが可能である。

4-1-2 材料および方法

分析は、(社)日本栽培漁業協会百島分場と京都府立海洋センターにおいて中間育成されていた尾叉長それぞれ62.8mmおよび55.4mmのマダイ稚魚を用いた。耳石は扁平石を採取し、99.5%エタノールで超音波洗浄を数回行い、汚れを取り除いた後、エポキシ樹脂で包埋した。樹脂が十分に固化したことを確認し、研磨を行った。研磨材にはカーボランダムとアルミナを用いた。耳

石の焦点部分が現れるまで徐々に細かな研磨材に変えて注意深く行った。最終的には6000番のアルミナで鏡面に仕上げ、その表面を光学顕微鏡で観察・撮影した (Fig.4-1-1)。

WD-EPMAは京都府中小企業総合センターに設置された島津EPMA-8705を用いた。研磨した耳石サンプルは電子線の照射に伴う電荷の蓄積 (charge-build-up) を防ぐためにカーボンで表面をコーティングした。測定はFig.4-1-1のAからBを加速電圧15kV、電流50nA、ビーム径10 μ m、各点の測定時間30秒で行った。ストロンチウムの特性X線は $L\alpha$ をPETを用いて検出した。マダイ稚魚の生息水温はMDS-Tを用いて測定した。

4-1-3 結果

ストロンチウムの特性X線のカウント数はストロンチウムの濃度に比例しているのでカウント数と水温変動とを比較対応した。

耳石縁辺部B点を採捕した日とし、その日から遡って成長線を数えてA点到該当する日を推定し、その間の水温変動とストロンチウムのカウント数とを対応させた (Fig.4-1-2)。ストロンチウム濃度の変動と水温変動との相関を検討するために散布図を描いた (Fig.4-1-3)。Fig.4-1-2aが百島のサンプルであるが、ストロンチウムのカウント数と水温変動との対応が、前半部分 (A) と後半部分 (B) で明らかに異なっているので、散布図も (A) (B) に分けて描いた。

これらの散布図からストロンチウムの濃度と水温変動を比較すると百島の前半部分 (A) で相関係数 $R=0.639$ 、宮津では全期間を通して $R=0.561$ で相関が見られたが、百島の後半部分 (B) では相関は見られなかった。

4-1-4 考察

ほぼ同じ尾叉長の稚魚から得た耳石を比較したが、断面のストロンチウム濃度の変動は大きく異なっていた。この違いの要因の多くは水温変動の違い

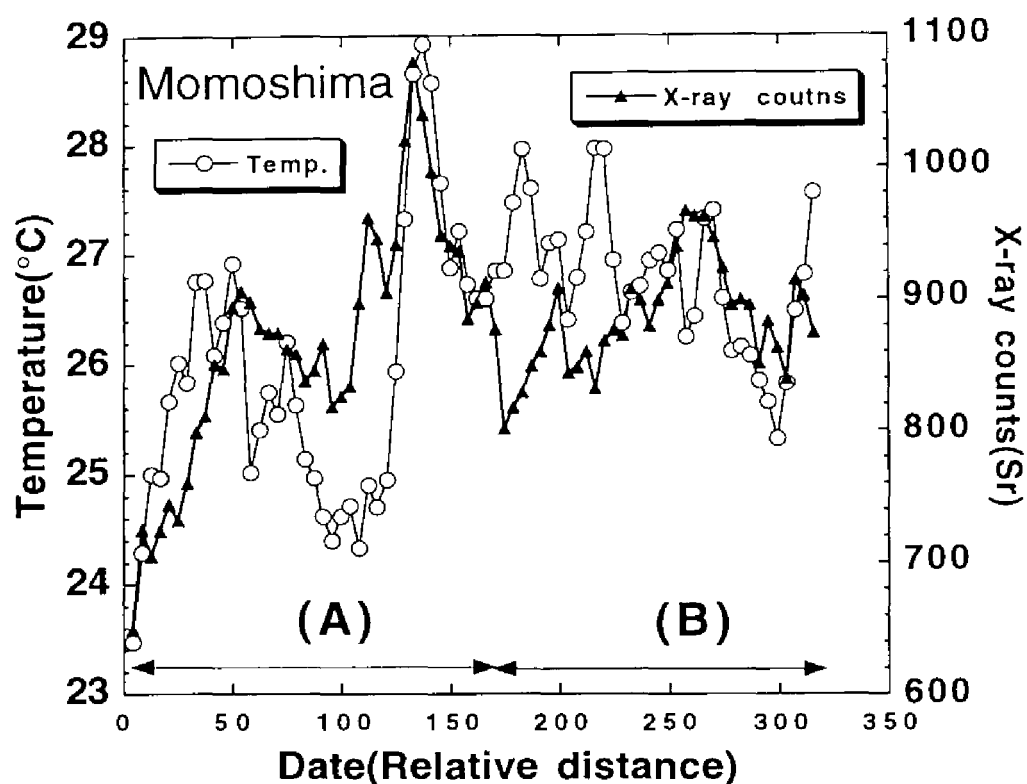


Fig.4-1-2a. Comparison between Sr X-ray counts fluctuation and temperature fluctuation in Momoshima.

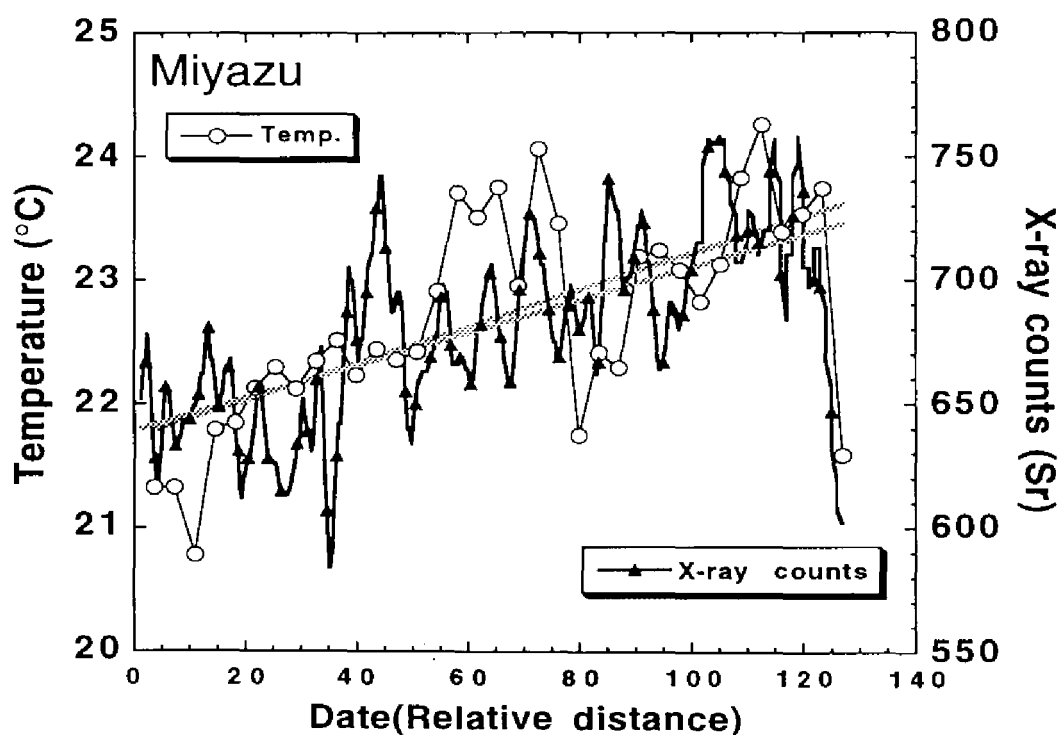


Fig.4-1-2b. Comparison between Sr X-ray counts fluctuation and temperature fluctuation in Miyazu.

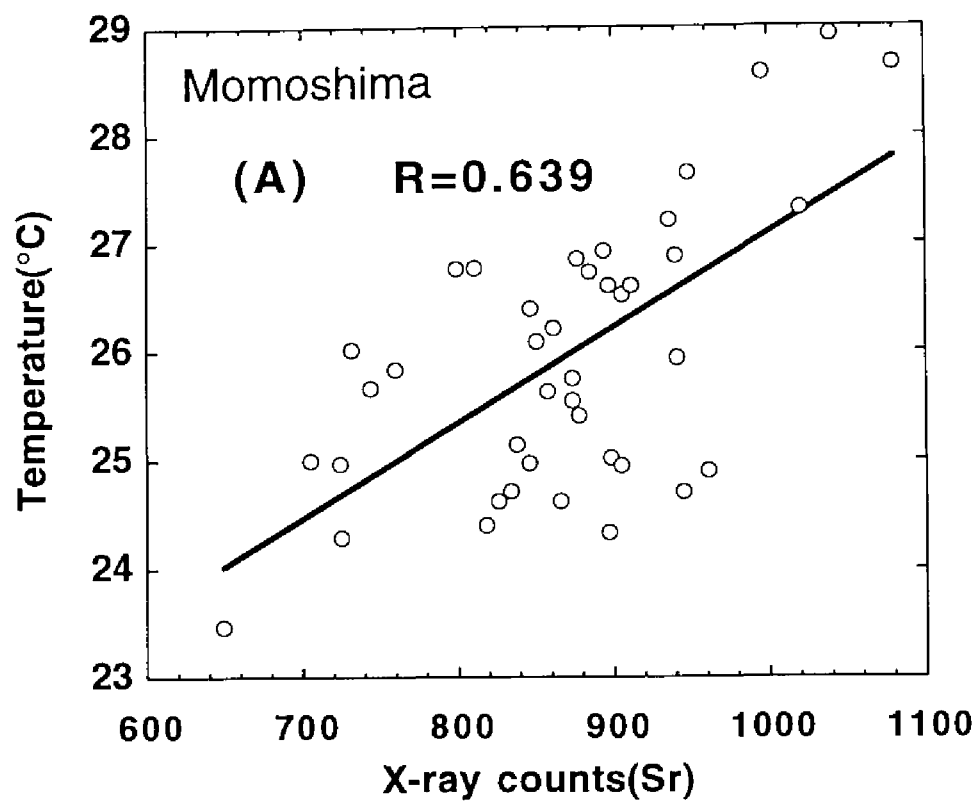


Fig.4-1-3a. Correlation between Sr X-ray counts and temperature in Momoshima (A).

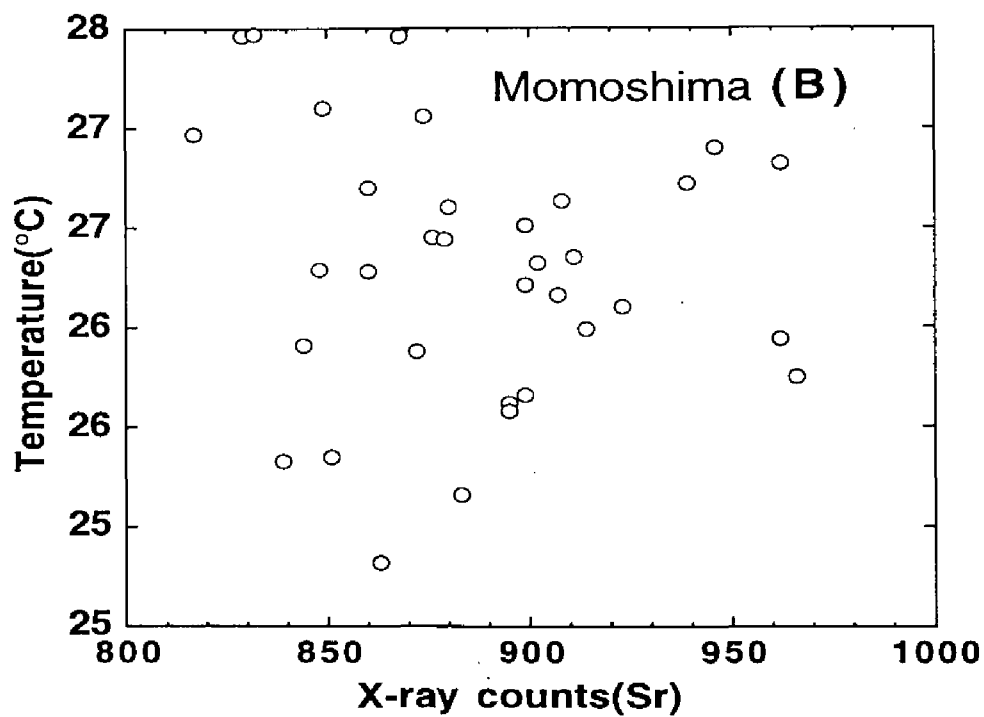


Fig.4-1-3b. Correlation between Sr X-ray counts and temperature in Momoshima (B).

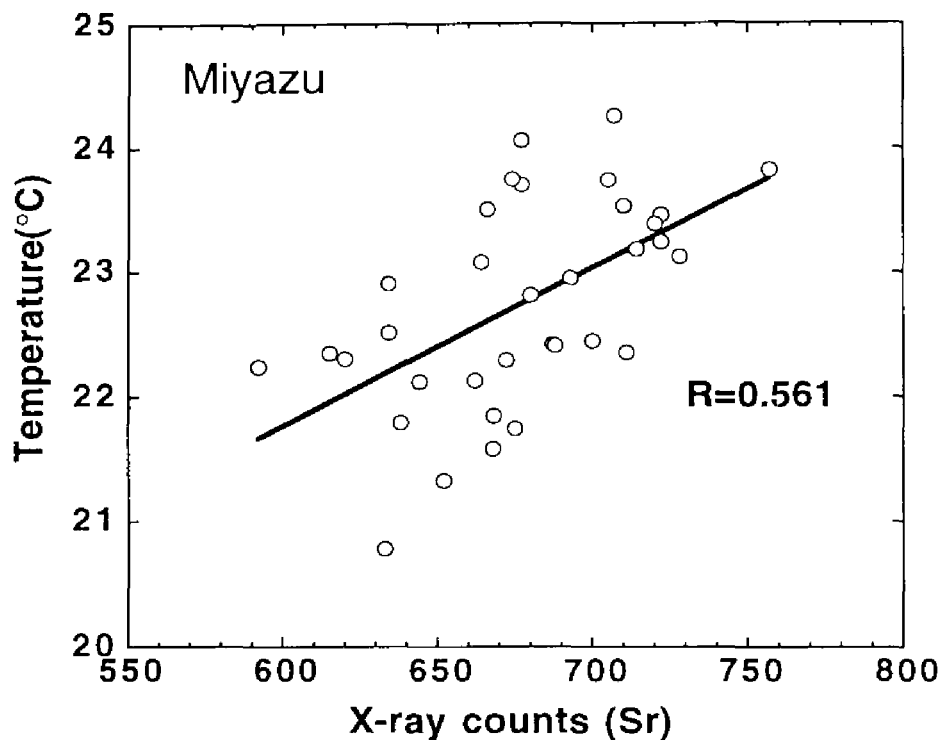


Fig.4-1-3c. Correlation between Sr X-ray counts and temperature in Miyazu.

に起因すると考えられるが、他の要因も排除できない。特に宮津の変動 (Fig.4-1-2b) の最後の部分でストロンチウムが急激に低下する。水温も同時に低下しているが、この水温低下の原因は降雨による。すなわち、水温の低下と同時に塩分の低下もストロンチウム濃度の低下に影響を与えていると考えられる。第2章で淡水魚と海産魚の比較を行ったが、塩分が低い場合、ストロンチウム濃度が減少する (Secor, 1992; Kalish, 1990)。マダイの場合、天然魚では降雨があっても直接低塩分の影響を受けることは考え難いが、沿岸の中間育成施設で飼育されている場合、降雨や陸水の影響を受けることを考慮に入れねばならない。逆に、水温変化とともに稚魚の成育に影響のない範囲で塩分を人為的に調節することで、人工的に耳石にマーキングを施すことも可能である。

百島の前半部分 (A) と後半部分 (B) では明らかに水温とストロンチウム濃度の関係が異なっている。この原因としては、後半部分 (B) の水温は、およそ 24℃ から短期間に 5℃ 近くもの急激な水温上昇とマダイ稚魚にとっては極端に高い水温となっている。石岡 (1984) は急激な水温上昇はマダイのストレス反応を引き起こし、血液中のマグネシウムやカルシウム量が増加することを見いだしている。すなわち、マダイ稚魚にとって百島での後半部分 (B) のような極端な水温上昇・高水温状況下では、水温と耳石中のストロンチウム濃度との一定の関係は失われると考えられる。一方、宮津の場合は、実験期間中の水温は 21℃ から 24℃ の範囲で徐々に上昇しており、このような水温変動に対しては水温とストロンチウム濃度との一定の関係が保たれると考えられる。

4-2 微量元素による日本海ヒラメの個体群解析の試み

4-2-1 研究の背景と目的

ヒラメはマダイとともに栽培漁業の対象種として積極的な種苗生産および放流が行われており、1994年には全国1,335カ所で21,574千尾の稚魚が放流された。放流後のヒラメ稚魚の回遊生態は昭和50年から開始された国の補助事業で標識放流等を中心とした調査研究が行われてきた。しかし、近年、種苗放流量の増大に伴い、人工種苗の生態系への影響、特に遺伝的な多様性への懸念が指摘されだした。今や栽培漁業の推進において、「責任ある栽培漁業 - responsible approach to "SAIBAI"」が種苗生産時の疾病対策と並ぶ大きな課題となっている（今村，1997）。

こうした背景の下で、対馬暖流域のヒラメの総合的な研究が開始されており、既に臀鰭鰭条数が地域によって異なっていることが報告されている（木下ら，1993；Tanaka et al., in press）。これらが同一親魚から生まれた個体が環境によって変化したものか、あるいは全く個別に遺伝的特性による差なのかは不明である。しかし、いずれにしても重要水産資源であるヒラメの資源を適正に管理していくためには、地域ごとに異なる個体群が存在し、生息している状態をその分布域、環境特性等を比較し検討する必要がある。

本章では対馬暖流域のヒラメの耳石中の微量元素をPIXEで分析し、その地域間格差を検討した。

4-2-2 材料および方法

供試魚は、秋田県、石川県、京都府（2カ所）および福岡県の各地先で小型定置網、小型底引き網または刺し網で漁獲された1歳魚のヒラメを雌雄5尾計10尾ずつ用いた。漁法、漁獲日、雌雄別の全長をTable 4-2-1に示した。Kyoto (1) と Kyoto (2) は京都府下の東端と西端とに位置し、およそ60km離れていた。サンプルの採集地をFig.4-2-1に示す。

Table 4-2-1. Japanese flounder samples: fishing areas, gears date, and total length \pm SD.

(Unit: cm)

Areas	N*	Fishing gears	1995	Male	Female	M+F
Akita	10	Small set nets	28 August	24.4 \pm 1.0	23.9 \pm 1.2	24.2 \pm 1.1
Ishikawa	10	Gill nets	30 June & 5 July	25.8 \pm 0.7	26.5 \pm 0.9	26.1 \pm 0.9
Kyoto(1)	10	Gill nets	11-17 July	32.9 \pm 2.1	34.2 \pm 2.8	33.6 \pm 2.4
Kyoto(2)	10	Gill nets	27-28 June	29.6 \pm 1.1	28.2 \pm 2.1	28.9 \pm 1.7
Fukuoka	10	Small trawls	5-6 June	27.1 \pm 1.9	28.0 \pm 0.9	27.6 \pm 1.5

* Male : Female = 5 : 5

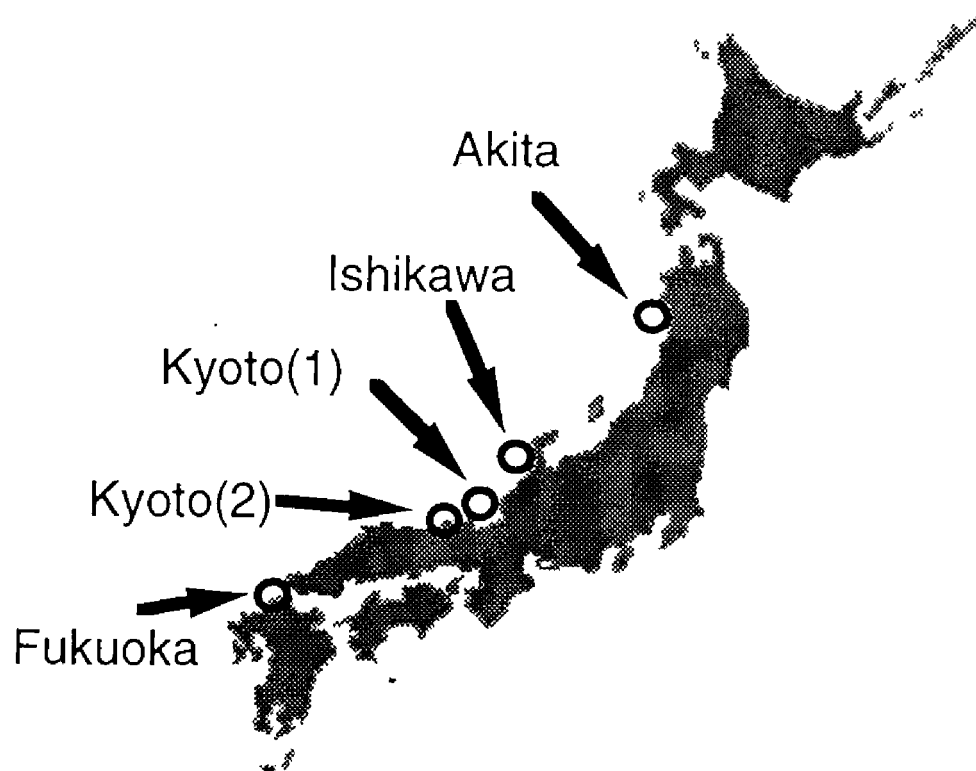


Fig.4-2-1. Sampling stations along with the coast of the Sea of Japan.

生息海域の水溫データを直接得ることができなかったので、日本海洋データセンター (JODC) が1955年から1992年までのデータを平均して公表している1度メッシュの水深別の水溫データから、当該府県の地先の区画の50 m水深の平均水溫を参考にした。

耳石は扁平石を取り出しPIXE分析に供した。取り出した耳石は99.5%エタ

ノール中で超音波洗浄を数回行い、汚れを取り除いた後、カーボンプレートにセメダインで固定した。

PIXE分析は京都大学大学院工学研究科原子核工学専攻放射実験室に設置されたイオンビーム分析装置を用いた。測定は2MeVのプロトンビームをスリットで1.5mm x 1.5mmに成形し、真空中でサンプルに照射して行った。サンプルからの特性X線はSi (Li) で検出した。定量分析を行うために、NIST limestone をペレット成形した標準試料を実験中に5~6回照射した。

得られたPIXEスペクトルの解析は、第2章で述べたとおりPIXAN (Clyaton, 1986) で行った。

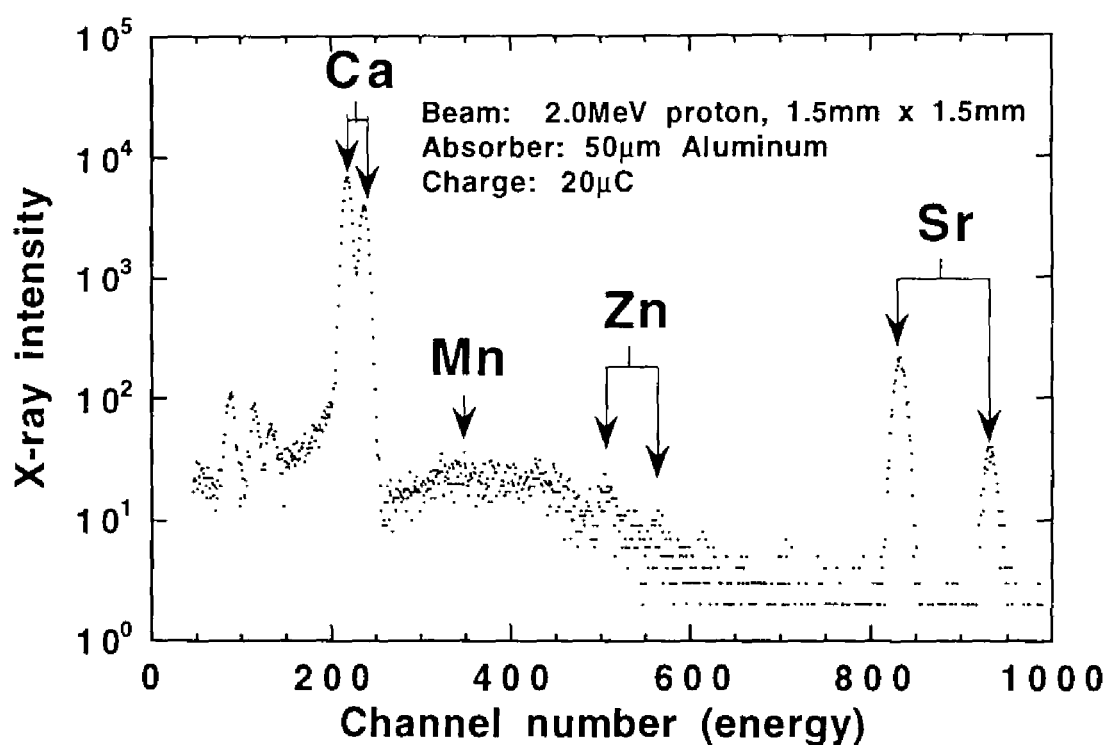


Fig.4-2-2. PIXE spectrum of an otolith from Japanese flounder (TL=27.5cm, caught by a small trawl in Fukuoka).

4-2-3 結果

ヒラメ耳石から得られたPIXEスペクトルをFig.4-2-2に示す。マダイ同様

Table 4-2-2. Trace element concentration in Japanese flounder otoliths.

(Unit: ppm±SD)

Areas	Sample number		Sr	Mn	Zn
	Total				
	Male	Female			
Akita	10		2151±156	24±9.3	23±13
	5		2120±193	21±8.2	21±14
	5		2192±115	27±10	24±13
Ishikawa	10		2421±339	25±9.9	17±13
	5		2452±388	20±8.3	18±14
	5		2392±326	29±10	17±14
Kyoto(1)	10		1537±150	15±4.8	3.5±2.0
	5		1470±146	15±6.1	2.7±1.5
	5		1606±134	15±3.9	4.4±2.2
Kyoto(2)	10		1591±81	13±5.9	4.7±3.1
	5		1626±81	12±2.2	6.3±4.0
	5		1556±73	14±3.3	3.3±1.3
Fukuoka	10		1901±212	14±4.8	14±5.0
	5		1956±224	16±5.4	17±20
	5		1847±210	12±3.7	11±5.9

に主成分のカルシウムの他にマンガン，亜鉛，ストロンチウムのピークが検出された．鉄のピークも検出されたが，バックグランドとして用いたカーボンプレートに少量の鉄が認められたので，定量分析は行わなかった．

ストロンチウム，マンガンおよび鉄の濃度を Table 4-2-2 に示す．各府県の地先 50 m 水深の 1955 年から 1992 年の平均水温と各元素濃度の平均値との関係を Fig.4-2-3 に示した．ストロンチウム，マンガン，亜鉛とも，水温と負の相関があった．

全ての地域および全ての元素濃度に雌雄間で有意な差は見られなかったのので，雌雄を合わせた各元素の濃度を地域間で比較した．分散分析を行い 5% の危険率で有意な差がある組合せを S，有意な差がない組合せを N とした一覧表を Fig.4-2-4 に示した．この結果，マンガンは秋田 - 京都 (1) (2)，秋田 - 福岡，

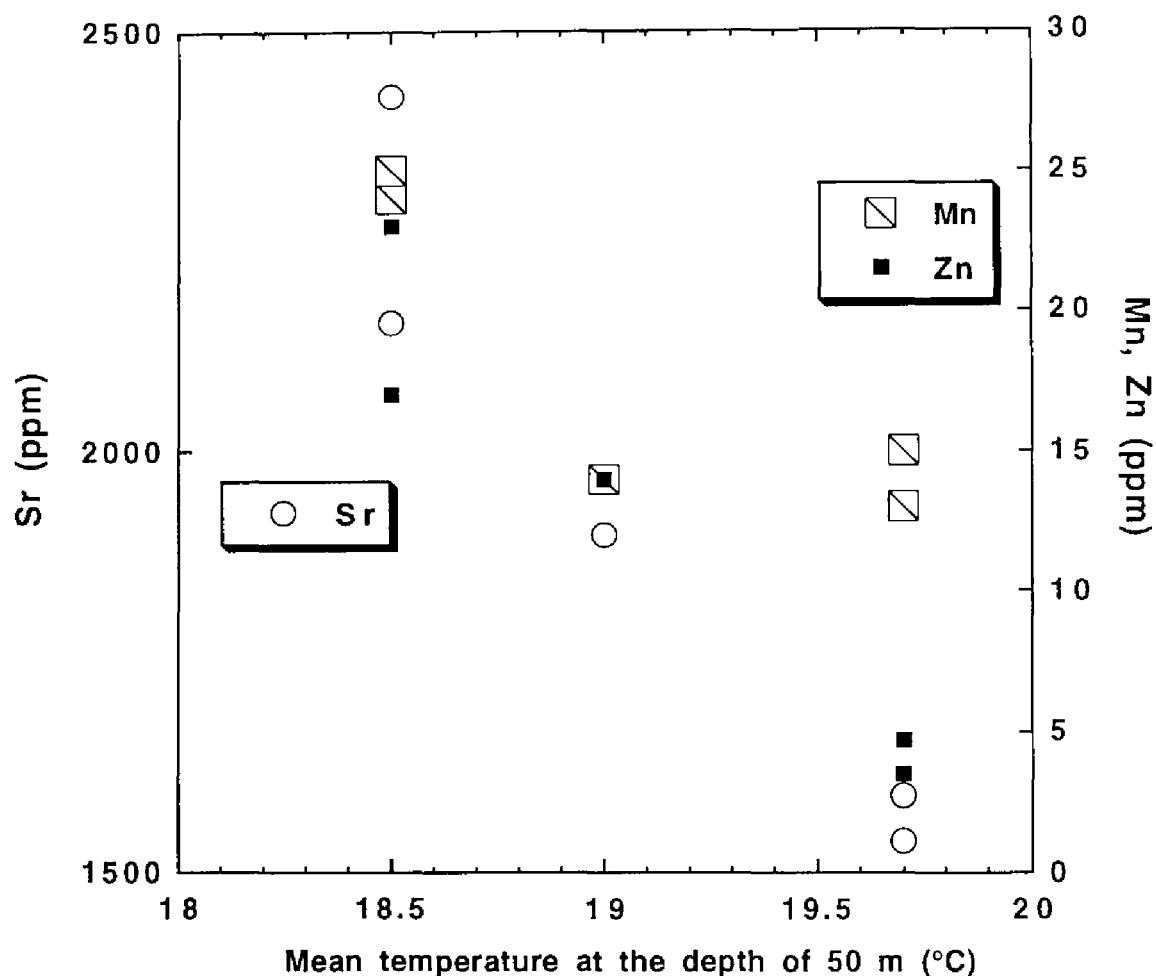


Fig.4-2-3. Correlation between mean temperature at the depth of 50 m and Sr, Mn, and Zn concentration in Japanese flounder otoliths.

The temperature was reported to JODC from 1955 to 1992 and archived in a one degree mesh.

石川 - 京都 (1) (2) で、亜鉛は秋田 - 京都 (1) (2), 石川 - 京都 (1) (2), 京都 (1) (2) - 福岡で、ストロンチウムは京都 (1) - 京都 (2) を除く全ての組み合わせで有意な差があった。

4-2-4 考察

ヒラメの成長に雌雄差があることは良く知られている (小林, 1974). しかし, 分析したヒラメは1歳魚で未だ雌雄による成長差が生じていない. このため, 微量元素にも雌雄差が見られないと考えられる.

耳石中の微量元素による系群解析は, *Chrysophrys auratus* (Edmonds et al.,

Mn

Akita	Ishikawa	Kyoto(1)	Kyoto(2)	Fukuoka	
	N	S	S	S	Akita
		S	S	S	Ishikawa
			N	N	Kyoto(1)
				N	Kyoto(2)
					Fukuoka

Zn

Akita	Ishikawa	Kyoto(1)	Kyoto(2)	Fukuoka	
	N	S	S	N	Akita
		S	S	N	Ishikawa
			N	S	Kyoto(1)
				N	Kyoto(2)
					Fukuoka

Sr

Akita	Ishikawa	Kyoto(1)	Kyoto(2)	Fukuoka	
	S	S	S	S	Akita
		S	S	S	Ishikawa
			N	S	Kyoto(1)
				S	Kyoto(2)
					Fukuoka

Fig.4-2-4. Regional difference of trace element concentration in otoliths of Japanese flounder caught at different five sea areas. S: significant, N: no significant by ANOVA.

1989), 大西洋マダラ (Campana et al., 1994; Campana and Gagne, 1995), *Nemaactylus macropterus* (Thresher et al., 1994) などの魚種で行われている。特に, *Chrysophrys auratus* の場合, 別途行われた標識放流による結果と矛盾がない結果がでており, 漁業管理のための系群把握の有効な手段となり得る。

本節では, 微量元素として比較的含有量が多いストロンチウム, 亜鉛, マンガンを定量した。そして, 少なくとも京都府下の2海域で得たヒラメについてはこれら3元素の濃度に有意な差が検出されなかった。この結果だけから, この2つのサンプルが同一の個体群に属しているとは断言できない。しかし,

他の海域のサンプルと比較すれば、京都府下の2海域のサンプルは似かよった生息環境下で成育していたと推定できる。本節で供したサンプルは沿岸漁業の漁獲物を用いたため、現場海域での水温データを得ることができなかった。このため、供試魚の生息していた水温と微量元素濃度の関係を直接、比較検討することはできないものの、当該海域の平均的な水温とストロンチウム、マンガン、垂鉛の濃度とには明瞭な負の相関が見られたことから、ヒラメの場合、水温と耳石中の微量元素とには負の相関があることが、強く示唆される。この関係は、前章で解析したマダイとは逆の関係であるが、*Fundulus heteroclitus* (Radtke, 1989)、*Clupea harengus* (Townsent et al., 1992) で得られている関係と同じであり、今後、飼育実験による解析が望まれる。

西田ら (1996) は mtDNA の D ループ領域の解析から、日本周辺海域のヒラメの集団構造モデルを提唱している。これによると、日本周辺の地先には複数府県にまたがる程度の集団が多数存在するものの、集団間にかんがりの移動があるという。耳石中の微量元素の変動が仮に遺伝的な要因よりも生息環境、特に水温によって規定されているとするならば、木下ら (1993) が行った計数形質データとともに、mtDNA から得られるデータと組み合わせて検討することで、集団間の移動の状況を明らかにできる可能性がある。また、今回は、バックギンクに使用したカーボンに混入していた鉄の問題や測定をストロンチウムなど比較的含有量の多い元素に着目して行ったため、より低濃度の元素については十分な分析が行えなかった。しかし、Sie and Thresher (1992) が報告しているとおり、PIXE 分析はより低濃度の元素分析も十分可能であり、より多元素の濃度比較を行うことで魚類の個体群の解析への応用が可能と考えられる。

4-3 第4章のまとめ

1) 耳石の微量元素分析の応用として、マダイ稚魚個体の水温履歴解析と日本海対馬海流域のヒラメ1歳魚の個体群解析を試みた。

2) 前章の研究結果から、マダイ稚魚耳石中には1000～3000ppmのストロンチウムが含まれていることが分かったので、波長分散型EPMAで耳石断面の線分析を行った。この結果、ストロンチウムの濃度に比例する特性X線のカウント値と水温変動とは相関が見られた。ただし、マダイ稚魚の成育にとって適当でない水温の急上昇期や高水温下ではこの相関が失われることが示された。

3) 日本海対馬海流域の秋田、石川、京都(2海域)および福岡から得たヒラメ1歳魚の耳石をPIXE分析した。その結果、マダイの耳石と同様、ストロンチウム、マンガン、鉄、亜鉛等の微量元素が検出できた。これらの微量元素の濃度に雌雄差は見られなかったが、現場海域の平均水温とに負の相関が見られた。

4) 鉄以外のストロンチウム、マンガン、亜鉛について海域ごとに濃度の比較を行ったところ、約60km離れた京都府下の2海域から得たサンプル間のみ、全ての微量元素の濃度に有意な差が見られなかった。

5) 耳石中の微量元素濃度の解析は、計数形質データとともに、mtDNAから得られるデータと組み合わせて検討することで、個体群解析の有効な手法になり得る。

第5章 研究成果に対する考察

5-1 本研究の目的と結果

本研究の最終的な目的は、マダイの経験した水温履歴を硬組織である鱗や耳石から推定しようとするものである。そのための新たな解析手法の導入を行い、その可能性の検討も目的の一つである。

まず、鱗の鱗紋を形成している隆起線の形成と水温との関係を解明した。なお、鱗は成長とともに大きくなるが、加齢とともにLee現象によって体成長との関係が非線形となり解析が困難となる。このため、本研究では体成長と鱗の形成が直線的であると考えられる稚魚期を解析の対象とした。

水温を5段階に制御した飼育実験を行うとともに、1993年、1994年及び1995年に水温条件が異なる延べ14海域で中間育成された稚魚並びに延べ10海域から得た天然稚魚を供試魚として解析を行った。この結果、隆起線はほぼ一定の割合で形成されるものの、その割合は稚魚が成育した海域の水温と関係していること、及び、この関係は飼育実験から得られた関係、すなわち水温に対して上に凸な放物線であることが明らかとなった。また、隆起線と鱗径より定義した平均隆起線間隔値と平均水温とには負の相関が見られた。以上より、マダイ稚魚期の鱗の隆起線の形成割合及び平均隆起線間隔値から稚魚期の平均的な生息水温を推定することが可能である。

次に耳石の微量元素と水温との関係を解析した。鱗にも微量元素が含まれているが、鱗はミネラルのリザーバーとしての機能を有していることから、過去の履歴を継続的に保持しているとは考え難いため、本研究では耳石を用いた。

まず、微量元素の分析手法を検討した。既往の研究では、耳石を強酸で溶解して全体の成分を計測する方法、耳石を樹脂で包埋し、切断・研磨を行い、電子線励起によるX線分析(EPMA)を用いる方法が行われてきた。しかし、前者では得られて結果は生涯を通じた平均的な情報しか得られないこと、後者では十分な分析感度が得られないことなどから、新たな分析手法として荷電粒子励起X線分析(PIXE)を導入した。本研究によって、PIXEによって魚類耳石の表面を非破壊

で定量分析するために必要な諸条件と解析手順を検討・開発し、マダイをはじめとした数種類の魚類耳石中に含まれるストロンチウム、マンガン、鉄、亜鉛等の微量元素を極めて感度良く分析できることを示した。

耳石中の微量元素の内、特に含有量の多いストロンチウムについて、マダイ稚魚の耳石を用いて飼育水温との関係を求めた。この結果、マダイ以外の既往の研究で得られている関係とは逆に、水温の上昇とともにストロンチウム濃度が増えることが明らかとなった。さらに、稚魚期でみられるこの関係が若魚期では見られないことが分かった。

これらの結果を下に、1994年および1995年に延べ15海域から得たマダイ稚魚耳石の微量元素を分析したところ、尾叉長90mm未満の稚魚期のマダイではストロンチウムばかりでなく亜鉛についても水温が高いほどその濃度が高いことが明らかとなった。

耳石の微量元素分析の応用例として、個体の水温履歴解析と個体群解析を試みた。個体の水温履歴の解析には耳石の断面を成長方向に線分析を波長分散型EPMAで行った。EPMAにおいてもマダイ耳石中のストロンチウム濃度（数1000ppm）であれば、波長分散型の検出器を用いることで定量的な分析が可能である。この結果、マダイ稚魚の成育に適した水温条件下ではストロンチウム濃度は水温変動と相関があることが明らかとなった。最後に個体群解析の試みとして日本海のヒラメ耳石の分析を行った。この結果、京都府下の2海域間のみに、ストロンチウム、マンガン、亜鉛の濃度に有意な差は見られず、本手法の個体群解析への有効性が示唆された。

5-2 本研究の特色と残された課題

本研究では個体の履歴情報を解析する目的から鱗の年輪を構成する隆起線に着目し、年輪から得られる年単位の情報から一挙に日単位の情報の解析を行った。多くの魚類において、耳石に形成される成長線から日齢が推定できるが、実際、耳石の成長線を読み取るには多くの経験と技術、そして時間がかかる。一方、鱗の隆起線を読み取りには特殊な道具や技術を要することなく比較的簡単に行える。

このことは、将来的には自動処理が可能なことを意味している。本研究においては隆起線の読み取りの自動化は行わなかったが、原理的には十分可能であり今後の課題である。供試魚として選んだマダイは、栽培漁業の対象魚種として全国沿海府県の多くで種苗生産・中間育成・放流が行われている。特に近年、栽培漁業の事業としての展開が図られており、種苗放流の効果を的確に把握することが重要な課題となっている。こうした背景の下で、稚魚期の飼育水温の履歴が鱗の隆起線に刻まれているならば、それを標識として用いることが可能となろう。また、この場合、解析の自動化は現場において効率的な調査を遂行する上で必要条件である。残された課題としては、稚魚期の飼育水温を任意に制御することで再現性のある隆起線間隔値を刻み込む技術を開発することである。

本研究で導入したPIXEは、非破壊多元素同時分析手法として近年注目されている。しかし、その利用については、未だ汎用のスペクトル集や標準試料の整備がなされていない上に、装置の本体である加速器の運転、得られたスペクトルからの解析に要する原子核物理の理解など、従来の水産学の分野ではなじみのない素養を要求される手法であった。本研究では、PIXEでは草分け的な研究を行ってきた理化学研究所をはじめ本学工学研究科等との共同研究を通じて短期間で生物試料の分析に応用することに成功した。

PIXEの特徴を活かして魚類耳石の表面を短時間で非破壊同時に分析することが可能となった。また、表面の微量元素を供試魚が最後に経験した環境水温と対応させることで、水温と微量元素の濃度との関係を求めることができた。しかし、個体の履歴情報は耳石の内部に時系列で刻まれており、これを復元するためには分析プローブをミクロンオーダーに絞り込むことが必要である。現在、我々が使用している装置ではプローブをスリットで最大限0.1 mmまでしか絞れない。将来の課題としては、ビームを絞り込む装置の導入を望みたい。また、現在建設中のSPring-8による分析も視野に入れる必要があろう。SPring-8は非常にコヒーレントなX線(放射光)をミクロンオーダーに絞り込むことで微小領域の微量元素を分析することが可能である。

文献

- Arai, N., Sakamoto, W., and Maeda, K. (1994) PIXE analysis of otoliths from several species of teleost fish. *Int. J. PIXE*, **4**, 123-129.
- Arai, N., Sakamoto, W., and Maeda, K. (1995) Analysis of trace elements in fish otoliths by in-air PIXE. *RIKEN Accel. Prog. Rep.*, **28**, 30.
- Arai, N., Sakamoto, W., and Maeda, K. (1996) Correlation between ambient seawater temperature and strontium-calcium concentration ratios in otoliths of red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Sci.*, **62**, 652-653.
- 畔田正格, 池本麗子, 東 幹夫 (1980) 志々伎湾における底生生活期マダイ当歳魚の分布と成長. 西水研報, **54**, 259-278.
- Bilton, H. T. (1974) Effect of starvation and feeding on circulus formation on scales of young sockeye salmon of four racial origins, and of one young kokonee, coho and chinook salmon. *Proc.Int.Symp.The aging fish*, 40-70.
- Broecker, W. S. (1981) 海洋化学 (新妻信明訳), 東京大学出版会, 東京, pp.90-94.
- Campana, S. E. and Gagné, J. A. (1995) Cod stock discrimination using ICPMS elemental assays of otoliths. Recent developments in fish otolith research, ed. by Secor, D. H. and Campana, S. E., Univ. South Carolina Press, 671-691.
- Campana, S. E. and Neilson, J. D. (1985) Microstructure of fish otoliths. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **42**, 1014-1032.
- Campana, S. E., Fowler, A. J., and Jones, C. M. (1994) Otolith elemental fingerprinting for stock identification of atlantic cod (*Gadus morhus*) using laser ablation ICPMS. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **51**, 1942-1950.
- Carlström, D. (1963) A crystallographic study of vertebrate otoliths. *Biol. Bull.*, **125**, 441-463.
- Clayton, E. (1986) PIXAN: The Lucas Heights PIXE analysis computer package, AAEC/M113.
- Comar, C. L. and Wasserman, R. H. (1964) "Mineral metabolism," ed. by C. L. Comar and F. Bronner, Academic Press, New York and London, 523-572.
- Devereux, I. (1967) Temperature measurements from oxygen isotope ratios of fish otoliths. *Science*, **155**, 1684.
- Dodd, J. R. (1965) Environmental control of strontium and magnesium in *Mytilus*. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **29**, 385-398.
- Doyle, R. W., Talbot, A. J., and Nicholas, R. R. (1987) Statistical interrelation of length, growth, and scale circulus spacing: Appraisal of a growth rate estimation

- for fish. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **44**, 1520-1528.
- Edmonds, J. S., Moran, M. J., and Caputi, N. (1989) Trace element analysis of fish sagittae as an aid to stock identification: pink snapper (*Chrysophrys auratus*) in western Australian waters. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **46**, 50-54.
- Fisher, J. P. and Pearey, W. G. (1990) Spacing of scale circuli versus growth rate in young coho salmon. *Fish. Bull. U.S.*, **88**, 637-643.
- Gauldie, R. W., Fournier, D. A., and Dunlop, D. E. (1986) Atomic emission and proton microprobe studies of the ion content of otoliths of chinook salmon aimed at recovering the temperature life history of individuals. *Comp. Biochem. Physiol.*, **84A**, 607-615.
- Gauldie, R. W., Graynoth, E. J. and Illingworth, J. (1980) The relationship of the iron content of some fish otoliths to temperature. *Comp. Biochem. Physiol.*, **66A**, 19-24.
- Glenn, C. L., and Mathias, J. A. (1985) Circuli development on body scales of young pond-reared walleye (*Stizostedion vitreum*). *Can. J. Zoo.*, **63**, 912-915.
- Gunn, J. S., Harrowfield, J. R., Proctor, C. H., and Thresher, R. E. (1992) Electron probe microanalysis of fish otoliths - evaluation of technique for studying age and stock discrimination. *J. Expl. Biol. Ecol.*, **158**, 1-36.
- Horino, Y., Mokuno, Y., Kinomura, A., and Fujii, K. (1992) Microanalysis of human nails by PIXE measurement using heavy ion microprobes. *Int. J. PIXE*, **2**, 299-303.
- Ichii, T. and Mugiya, Y. (1963) Comparative aspect of calcium dynamics in calcified tissues in the goldfish *Carassius auratus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **49**, 1039-1044.
- 今村弘二 (1997) 年頭にあって. さいばい, **81**, 1-2.
- Johansson, S. A. E. and Campbell, J. L. (1988) PIXE, a novel technique for elemental analysis. John Wiley & Sons, London, pp.22-40.
- Kalish, J. M. (1989) Otolith microchemistry: validation of the effect of physiology, age and environment on otolith composition. *J. Expl. Bio. Ecol.*, **132**, 151-178.
- Kalish, J. M. (1992) Formation of a stress-induced chemical check in fish otoliths. *J. Expl. Biol. Ecol.*, **162**, 265-277.
- 加藤 守 (1985) シロザケに対するヨーロッパウム標識技術に関する最近の知見. 「サケ・マス増養殖の強化」(UJNR 水産増養殖専門部会), 日本水産資源保護協会, 55-69.
- 木下 泉, 青海忠久, 田中 克 (1993) 日本海沿岸におけるヒラメ稚魚の背・臀鰭鰭条数の地理的変異. 平成5年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, 96.

- Kinsman, D. J. J. and Holland, H. D. (1969) The co-precipitation of cations with CaCO_3 -IV. The co-precipitation of Sr^{2+} with aragonite between 16° and 96°. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **33**, 1-17.
- 北島 力 (1978) マダイの採卵と稚魚の量産に関する研究. 長崎水産試験場論文集, **5**, 1-92.
- Kobayashi, E., Sugihira, N., and Suzuki, K. T. (1991) Biological discrimination between calcium and strontium in kidneys and bone of young and adult rats. *Biol. Trace Elem. Res.*, **28**, 187-194.
- Machibata, H. (1981) Labeling fish with an activable element through diet. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **38**, 1281-1282.
- Machibata, H. and Hori, R. (1981) Labeling fish with an activable element. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **38**, 133-136.
- Maeda, K., Sasa, Y., Takami, M., and Uda, M. (1993) Determination of X-ray take-off angle from the L/K X-ray intensity ratio for PIXE. *Nucl. Inst. Meth.*, **B77**, 137-139.
- Masuda, F. (1985) Seasonal growth variation of elemental contents in the bivalve *Meretrix lusoria* from the Ariake Sea, Kyushu, Western Japan. *Ann. Rep. Inst. Geosci., Univ. Tsukuba*, **11**, 35-40.
- 増田富士雄 (1986) 炭酸塩生物殻中の元素含量は古水温計となりうるか. 地学雑誌, **95**, 1-26.
- 光永 靖 (1997) 酸素消費量と心拍数によるマダイ *Pagrus major* の代謝と遊泳行動に関する研究. 京都大学大学院農学研究科平成 8 年度修士論文.
- 麦谷泰雄 (1994) 魚類の耳石情報解析に関する研究. 日水誌, **60**, 7-11.
- Mugiya, Y. and Tanaka, S. (1995) Incorporation of water-borne strontium into otoliths and its turnover in the goldfish *Carassius auratus*: effect of strontium concentrations, temperature, and 17 β -estradiol. *Fisheries Sci.* **61**, 29-35.
- Nagata, Y., Arai, N., Sakamoto, W., Tago, Y., and Yoshida, K., (in press) Trace elemental analysis of otoliths of anadromous fish. *Int. J. PIXE*.
- 中村良成, 桑田 博 (1994) アリザリン・コンプレキソンによる稚魚への大量標識法における鱗からの標識検出法の検討, 栽培技研, **23**, 53-60.
- 西田 睦, 大河俊之, 藤井徹生 (1996) 3. 集団構造, 「ヒラメの生物学と資源構造」水産学シリーズ, **116**, 41-51.
- 野崎義行 (1992) 海水中の微量元素: 平均濃度と北太平洋における鉛直分布, 地球化学, **26**, 25-39.
- Otake, T., Ishii, T., Nakahara, M., and Nakamura, R. (1994) Drastic change in otolith strontium/calcium ratios in leptocephali and glass eels of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **112**, 189-193.
- 尾崎久雄, 安田秀明, 池田弥生 (1968) キンギョ (*Carassius auratus* L.) の鱗の成

長に関する研究. うろこ, **1**, 1-57.

- Pannella, G. (1971) Fish otolith: Daily growth layer and periodical patterns. *Science*, **173**, 1124.
- Prince, E. D., Lee, D. W., Zwelfel, J. R., and Brothers, E. B. (1991) Estimating age and growth of young Atlantic blue marlin *Makaira nigricans* from otolith microstructure. *Fish. Bull., U. S.*, **89**, 441-459.
- Radtke, R. L. (1989) Strontium-calcium concentration ratios in fish otoliths as environmental indicators. *Comp. Biochem. Physiol.*, **92A**, 189-193.
- Radtke, R. L., Townsend, D. W., Folsom, S. D., and Morrison, M. A. (1990) Strontium: calcium concentration ratios in otoliths of herring larvae as indications of environmental histories. *Environ. Biol. Fishes*, **27**, 51-61.
- Sakamoto, W. and Yuzuriha, H. (1993) Tracking free-swimming marine animals. *Sea-Tech.*, **34**, 25-27.
- Secor, D. H. (1992) Application of otolith microchemistry analysis to investigate anadromy in Chesapeake Bay striped bass *Morone saxatilis*. *Fish. Bull., U.S.*, **90**, 798-806.
- Sasa, Y., Maeda, K., and Uda, M. (1990) Application of PIXE analysis to materials science. *Nucl. Inst. Meth.*, **B49**, 569-572.
- Sie, S. H. and Thresher, R. E. (1992) Micro-PIXE analysis of fish otoliths: Methodology and evaluation of first result for stock discrimination. *Int. J. PIXE*, **2**, 357-379.
- Smith, M. K. and Kostlan, E. (1971) Estimates of daily age and growth of chu *Etelis carbunculus* in four regions of the Pacific from density of daily increments in otoliths. *Fish. Bull., U.S.*, **89**, 461-472.
- Smith, S. V., Buddemeier, R. W., Redalje, R. C., and Houck, J. E. (1979) Strontium: calcium thermometry in coral skeletons. *Science*, **204**, 404-407.
- Sweatman, J. J. and Kohler, C. C. (1993) Validation of daily otolith increments for young-of-the year. *J. Fish. Manage.*, **11**, 499-503.
- Szedlmayer, S. T., Able, K. W., Musick, J. A., and Weinstein, M. P. (1991) Are scale circuli deposited daily in juvenile weakfish, *Cynoscion regalis*?. *Environ. Biol. Fishes*, **31**, 87-94.
- Sudo, H., and Azeta, M. (1996) Life history and production of the amphipod *Byblis japonicus* Dahl (Gammaridea: Ampeliscidae) in a warm temperate zone habitat, Shijiki Bay, Japan. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **198**, 203-222.
- Suzuki, K., Maeda, K., Sasa, Y., Okada, A., Sakamoto, K., and Ozawa, T. (1993) Application of PIXE to source identification of Kosa aerosol: analysis of desert soils in China. *Nucl. Inst. Meth.*, **B75**, 317-320.

- 田中 克 (1993) 飼育魚と天然魚の比較. 「放流魚の健苗性と育成技術」水産学シリーズ, **93**, 19-30.
- Tanaka, M., Ohkawa, T., Maeda, T., Kinoshita, I., Seikai, T., Nishida, M. (in press) Ecological diversities and stock structure of the flounder in the Sea of Japan in relation to stock enhancement. *Bull.Natl.Res.Inst.Agriculture, Spe.* **3**.
- 戸嶋 孝, 桑原昭彦, 藤田真吾 (1995) 対馬暖流域におけるマダイ鱗の第1輪径組成の海域差, 日水誌, **61**, 874-879.
- Townsend, D. W. and Graham, J. J. (1981) Growth and age structure of larval Atlantic herring, *Clupea harengus*, in the Sheepscot river estuary, Maine as determined by daily growth increments in otoliths. *Fish. Bull.*, **79**, 123-130.
- Townsend, D. W., Radtke, R. L., Corwin, S., and Libby, D. A. (1992) Strontium: calcium ratios in juvenile Atlantic herring *Clupea harengus* L. otoliths as a function of water temperature. *J. Expl. Biol. Ecol.* **160**, 131-140.
- Townsend, D. W., Radtke, R. L., Morrison, M. A., and Folson, S. D. (1989) Recruitment implications of larval herring overwintering distributions in the Gulf of Main, inferred using a new otolith technique. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **55**, 1-13.
- Tucker, J. W. and Chester, A. J. (1984) Effects of salinity, formalin concentration and buffer on quality of preservation of southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) larvae. *Copeia*, **4**, 981-988.
- Tzeng, W. and Tsai, Y. C. (1994) Changes in otolith microchemistry of the Japanese eel, *Anguilla japonica*, during its migration from the ocean to the river of Taiwan. *J. Fish Biol.*, **45**, 671-683.
- Tzeng, W. N. (1994) Temperature effects on the incorporation of strontium in otolith of Japanese eel *Anguilla japonica*. *J. Fish Biol.*, **45**, 1055-1066.
- Tzeng, W. N. (1996) Effects of salinity and ontogenetic movements on strontium: calcium ratios in the otoliths of the Japanese eel, *Anguilla japonica* Temminck and Schlegel. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **199**, 111-122.
- Tzeng, W. N., Wu, H. F., and Wickstrom, H. (1994) Scanning electron microscopic analysis of annulus microstructure in otolith of European eel, *Anguilla anguilla*. *J. Fish Biol.*, **45**, 479-492.
- 山田寿郎, 麦谷泰雄 (1988) 硬骨魚類の耳石および鱗の成長と石灰化. 海洋生物の石灰化と系統進化 (大森, 須賀, 後藤編), 東海大学出版会, pp.203-217.
- 山岡耕作 (1993) 行動から見た健苗性. 「放流魚の健苗性と育成技術」水産学シリーズ, **93**, 41-50.
- 安田秀明 (1958) 鱗の鱗紋の研究—II, 鱗紋の形成. 日水誌, **25**, 95-99.
- 渡会 理, 五十嵐 満 (1995) 魚鱗情報によるシロザケの母川回帰解析. 海洋理工学会誌, **1**, 23-29.